

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Penetrationseigenschaften von beschichtetem mikrofeinem Titandioxid

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Christiane Rickmeyer
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann
 2. Prof. Dr. Reinhard Neubert
 3. Prof. Dr. med. Jean Krutmann

Datum der Promotion: 10. Juni 2002

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	UV-LICHT	6
1.2	NATÜRLICHER SONNENSCHUTZ	8
1.3	KÜNSTLICHE LICHTSCHUTZMITTEL	10
1.4	TITANDIOXID	11
1.5	PENETRATIONSMECHANISMEN	13
1.6	PENETRATIONSMESSUNGEN	14
1.7	ABRISSMETHODE	15
1.8	PENETRATIONSVERHALTEN VON TITANDIOXID	16
1.9	ZIELE UND PROBLEMSTELLUNGEN	17
2	MATERIAL UND METHODIK	19
2.1	MATERIAL	19
2.1.1	Emulsion	19
2.1.2	Titandioxid-Mikropartikel	19
2.1.3	Tesafilm	21
2.1.4	Osmiumtetroxid	21
2.2	PROBANDEN	21
2.3	ABRISSMETHODE	21
2.3.1	Ermitteln der Emulsionsmenge	22
2.3.2	Applikation der Emulsion	22
2.3.3	Entnahme der Abrisse	24
2.3.4	Spektroskopische Messung der Extinktion der Hornschuppen auf den Abrissen	26
2.3.5	Berechnen des Hornschichtprofils	27

2.3.6	Messung der Konzentration der Substanz auf den Abrissen	28
2.3.7	Erstellen des Penetrationsprofils	28
2.4	ERSTER TEIL DER VERSUCHE: PENETRATION	29
2.4.1	Vorversuch: Überprüfung des Abrissverfahrens	29
2.4.2	Versuch: Langzeitpenetration verschiedener Titandioxid-Partikel	30
2.5	ZWEITER TEIL DER VERSUCHE: PENETRATIONSWEGE	31
2.5.1	Erster Vorversuch: Detektion der Follikelöffnungen auf den Abrissen	31
2.5.2	Zweiter Vorversuch: Detektion der Partikel mit Laser-Scan-Mikroskopie	32
2.5.3	Versuch: Ortsaufgelöster Nachweis der Partikel auf den Abrissen	33
2.5.4	Versuch: Nachweis der Follikelpenetration durch eine Biopsie	33
3	ERGEBNISSE	35
3.1	ERSTER TEIL DER VERSUCHE: PENETRATION	35
3.1.1	Vorversuch: Überprüfung des Abrissverfahrens	35
3.1.2	Versuch: Langzeitpenetration verschiedener Titandioxid-Partikel	37
3.2	ZWEITER TEIL DER VERSUCHE: PENETRATIONSWEGE	43
3.2.1	Erster Vorversuch: Detektion der Follikelöffnungen auf den Abrissen	43
3.2.2	Zweiter Vorversuch: Detektion der Partikel mit Laser-Scan-Mikroskopie	44
3.2.3	Versuch: Ortsaufgelöster Nachweis der Partikel auf den Abrissen	45
3.2.4	Versuch: Nachweis der Follikelpenetration durch eine Biopsie	50
4	DISKUSSION	54
4.1	IST DIE ABRISSMETHODE NACH DEM ANGEWANDTEN VERFAHREN FÜR QUANTITATIVE PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN GEEIGNET?	54
4.2	WIE TIEF PENETRIERT TITANDIOXID IN DIE HORNSCHICHT?	55
4.3	WIE VERÄNDERT SICH DIE TITANDIOXID-KONZENTRATION IM LAUFE DER TAGE?	56
4.4	WELCHEN EINFLUSS HABEN UNTERSCHIEDLICHE BESCHICHTUNGEN DES TITANDIOXIDS AUF DEN PENETRATIONSPROZESS? WELCHE ROLLE SPIELEN INTERINDIVIDUELLE UNTERSCHIEDE?	57

4.5	KANN MAN MIT OSMIUMTETROXID DIE POSITION DER HAARFOLLIKEL AUF DEN ABRISSEN SICHTBAR MACHEN? _____	57
4.6	KÖNNEN DIE PARTIKEL MIT FLUORESZENZMESSUNGEN UNTER DEM LASER-SCAN-MIKROSKOP SICHTBAR GEMACHT WERDEN? _____	58
4.7	WELCHE ROLLE SPIELEN DIE FOLLIKEL BEI DER PENETRATION VON TITANDIOXID? _	58
4.8	WIRD IN ALLEN HAARFOLLIKELN TITANDIOXID GEFUNDEN? _____	60
4.9	WELCHE AUSSAGEN KÖNNEN ZUM EINSATZ VON TITANDIOXID ALS SONNENSCHUTZMITTEL GEMACHT WERDEN? _____	60
5	ZUSAMMENFASSUNG _____	62
6	LITERATURVERZEICHNIS _____	64
7	PUBLIKATIONSLISTE _____	76
	DANKSAGUNG _____	77
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG _____	78

1 EINLEITUNG

Der Anstieg der Hautkrebserkrankungen wird in erheblichem Maße zurückgeführt auf fehlerhaften Umgang mit Sonnenlicht, im speziellen auf ungenügenden Sonnenschutz [47, 52]. Die Kenntnis der Wirkung von Sonnenschutzmitteln ist daher von großer Bedeutung für die Gesundheit des Menschen.

Beschichtete Titandioxidpartikel werden in vielen kommerziellen Sonnenschutzprodukten eingesetzt. Ohne diesen physikalischen UV-Filter sind ein hoher Lichtschuttfaktor und ein sicherer Schutz im UVA-Bereich nur schwer zu erreichen [77].

Trotz der breiten Verwendung gibt es nur wenige Publikationen, die sich mit den Penetrationseigenschaften von Titandioxid auseinandersetzen.

Um die protektive Wirkung eines Sonnenschutzmittels zuverlässig beurteilen zu können, muss man den Wirkort und die Penetrationskinetik an der Haut kennen. Das ist für Titandioxid von besonderer Bedeutung, da für diese Verbindung photokatalytische Reaktionen unter UV-Bestrahlung diskutiert werden [11, 91]. Bei Kontakt der Partikel mit lebenden Zellen wären UV-induzierte Veränderungen nicht auszuschließen.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, das Penetrationsverhalten unterschiedlich beschichteter Titandioxidpartikel zu untersuchen.

1.1 UV-Licht

Die nichtionisierende elektromagnetische Sonnenstrahlung kann man in ultraviolette, sichtbare und infrarote Strahlung einteilen. UV-Strahlung in zu hohen Dosen schadet dem menschlichen Organismus. Sie wird abhängig von der Wellenlänge in UVA, UVB und UVC unterteilt. Die UVA-Strahlung lässt sich weiter in UVA₁ und UVA₂ untergliedern (Tabelle 1) [29]. Da Wellenlängen unter 290 nm von der Ozonschicht der Atmosphäre absorbiert werden und so die Erdoberfläche nicht erreichen, ist die UVC-Strahlung und der kurzwellige Anteil der UVB-Strahlung des Sonnenlichts für den menschlichen Organismus nicht relevant [29]. Die UVA-Intensität der natürlichen Sonnenstrahlung ist um das 10 – 20-fache höher als die UVB-Intensität [36, 84]. Die Zusammensetzung der UV-Strahlung ist abhängig von der Jahreszeit, der geographischen Lage und der Tageszeit. Auch die meteorologischen und atmosphärischen Bedingungen haben einen Einfluss auf die spektrale Intensitätsverteilung der Sonnenstrahlung

in Erdnähe, insbesondere auf das UV-Licht [29].

Durch die Änderung der Lebens- und Freizeitgewohnheiten setzt sich die Bevölkerung heute bewusst einer wesentlich höheren Dosis der UV-Strahlung aus als noch vor Jahren [82].

Tabelle 1: Elektromagnetische Strahlung der Sonne [29].

Wellenlänge [nm]	Strahlung
100 – 400	UV-Strahlung
100 – 290	UVC
290 – 320	UVB
320 – 400	UVA
320 – 340	UVA ₁
340 – 400	UVA ₂
400 – 780	Sichtbares Licht
780 – 5000	Infrarotstrahlung

UV-Licht wird bei zahlreichen dermatologischen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt. Es hat einen positiven Einfluss auf die Vitamin-D-Synthese und damit auf den Knochenstoffwechsel [16, 52].

Die Zielorgane der UV-Strahlung beim Menschen sind die Grenzorgane zur Außenwelt, die Haut und die Augen.

Am Auge kann es durch UV-Strahlung zur Kataraktbildung kommen [82].

Nach erhöhter UV-Exposition bildet sich an der Haut akut ein Erythem, besonders leicht bei Menschen mit sensibler Haut. Bei abnorm reagierender Haut kann eine Photodermatose ausgelöst werden [3, 27, 30, 48, 71].

UV-Strahlung ist ein direktes Karzinogen und induziert Hautmalignome. Das Wachstum und die Ausbreitung werden durch die gleichzeitige Unterdrückung der Schutz- und Reparaturmechanismen gefördert [27, 48, 71, 92].

Das Immunsystem wird zunächst lokal und bei höheren Dosen auch systemisch supprimiert.

Bis vor einiger Zeit ging man davon aus, dass die UVA-Strahlung keine große Relevanz für die beschriebenen Schädigungen besitzt [28]. Inzwischen wurde gezeigt, dass UVA sehr wohl signifikant an der Induktion von Hautkrebs, der Beeinträchtigung der Immunfunktion der Haut und der Auslösung bestimmter Photodermatosen wie z.B. der polymorphen Lichtdermatose beteiligt ist [15, 48].

Langfristig führt UVA-Strahlung im Bindegewebe zur vorzeitigen Hautalterung, da die langwellige, energieärmere UVA-Strahlung tiefer in die Haut eindringt als das kurzwellige UVB-Licht [48, 55, 71]. Dadurch wird die Elastin- und Kollagenfaserstruktur des Bindegewebes geschädigt und die Lichtalterung der Haut ausgelöst [52].

Tabelle 2: Photobiologische Hauttypen der Europäer [14].

Hauttyp	Phänotyp	Reaktion auf UV-Licht	
		Sonnenbrand	Bräunung
I	Helle Haut Rötliche bis rotblonde Haare Blaue oder grüne Augen.	immer	nie
II	Helle Haut Blonde bis hellbraune Haare Blaue, graue oder braune Augen	immer	wenig
III	Hellbraune Haut Dunkelblonde bis braune Haare Braune Augen	selten	gut
IV	Hellbraune bis mittelbraune Haut Dunkelbraune Haare Braune Augen	nie	immer

Es gibt einen weitgehenden Konsens darüber, dass die schützende Ozonschicht der Atmosphäre abnimmt. Folge davon ist eine Erhöhung der UVB-Strahlung, die die Biosphäre erreicht [13, 61, 71, 92].

Auch unter diesem Gesichtspunkt haben die Erforschung und Weiterentwicklung von Sonnenschutzprodukten eine große Bedeutung.

1.2 Natürlicher Sonnenschutz

Es gibt grundsätzlich zwei Prinzipien, die Haut vor Schäden durch die Sonne zu schützen:

- Protektion lebender Zellschichten vor UV-Strahlung durch Streuung, Reflexion und Absorption in der obersten Hautschicht.
- Reparatur der durch UV-Licht entstehenden Veränderungen in den Zellen der Haut.

Diese Prinzipien werden durch unterschiedliche körpereigene Schutzmechanismen realisiert.

Das Melanin der Haut und die Bildung der Lichtschwiele vermindern die Dosis der UV-Strahlung, die die Zellen erreicht. Die DNS-Reparaturmechanismen und der programmierte

Zelltod bei Überlastung dieser Mechanismen treten bei bereits entstandenen Schäden in Kraft [72].

Melanin wird in den Melanozyten der Basalschicht gebildet, über deren Dendriten in Melanosomen an die basalen Keratinozyten herangebracht und von diesen aufgenommen [14]. Die Relation von Eumelanin (braun) und Phaeomelanin (gelbrötlich), die Größe der Melanosomen und deren Zahl und Gruppierung spielen eine Rolle für den Pigmentierungstyp [14].

Der Bräunung der Haut liegen zwei unterschiedliche Reaktionen zugrunde. Die Sofortpigmentierung, v. a. durch UVA- und sichtbares Licht ausgelöst, beruht auf der Photooxidation ungefärbter Melaninvorstufen [75]. Sie tritt innerhalb von Minuten ein und hält ca. 24 Stunden an.

Die Spätpigmentierung erfolgt durch eine Steigerung der Melanogenese und der Synthese der Vorstufen. Sie wird durch UVA- und UVB-Strahlung ausgelöst und innerhalb von 1-4 Tagen sichtbar [14].

Durch die Aktivierung des melanozytären Systems kann ein zusätzlicher UVB-Schutz entsprechend LSF 2-4 (s.u.) erreicht werden. Im Gegensatz dazu bewirkt die Lichtschwielenbildung der Hornhaut durch Hyperkeratose und Akanthose, die nach längerer UV-Exposition aktiviert wird, einen Lichtschutzfaktor bis zu 20 [78].

Die Schädigung der DNS durch UV-Licht kann durch drei verschiedene körpereigene Mechanismen repariert werden (Photoreaktivierung, Exzisionsreparatur, Postreplikationsreparatur) [44, 62, 79]. Gelingt der Zelle die Reparatur nicht, gibt es einen weiteren Schutzmechanismus, der den Zelltod herbeiführt (Apoptose), um so die Gefahr der malignen Entartung zu umgehen [75].

Der Schutz vor der Sonne, der durch adäquates Verhalten und geeignete Kleidung erreicht wird, ist weitaus größer als der Effekt durch das Auftragen von Lichtschutzmitteln [83]. Daher sollte man vorrangig darauf achten, die Sonne insbesondere in den Mittagsstunden zu meiden und die UV-Strahlung durch lichtundurchlässige Kleidung, eine schützende Kopfbedeckung und eine Sonnenbrille abzuhalten [83].

Zusätzlich sollten Sonnenschutzmittel appliziert werden, insbesondere wenn direkte Sonnenstrahlung nicht vermieden werden kann, z. B. beim Baden im Meer und bei der Arbeit in der Sonne [29, 78, 84].

1.3 Künstliche Lichtschutzmittel

Die ideale Substanz zum Schutz vor der UV-Strahlung ist ein Material, das für UVA- und UVB-Licht undurchlässig, biologisch und chemisch stabil und kosmetisch akzeptabel ist [28]. Seit über 60 Jahren gibt es kommerzielle Lichtschutzmittel. Sie wurden ursprünglich zum Schutz gegen den Sonnenbrand entwickelt [10, 84]. Da dieser vor allem durch den UVB-Anteil des Sonnenlichtes verursacht wird, kamen hauptsächlich Substanzen auf den Markt, die in diesem Bereich schützen, die organischen UVB-Filter [10]. Diese Moleküle absorbieren Teile des UV-Lichts und geben die aufgenommene Energie in Form von Wärme oder Licht oder durch Bereitstellung von Energie für unbedenkliche chemische Reaktionen wieder ab [83]. In seltenen Fällen kann diese erhöhte chemische Reaktivität jedoch Kontaktallergien, Photoallergien oder phototoxische Lichtreaktionen verursachen [72]. Da diese Substanzen relativ enge Absorptionsspektren besitzen und einzeln nicht in der Lage sind, einen hohen Lichtschutzfaktor zu erzeugen, werden sie heute grundsätzlich mit anderen organischen und zunehmend mit physikalischen Filtern kombiniert [29].

Die zweite große Gruppe der Lichtschutzmittel sind die physikalischen Filter, auch anorganische oder mineralische Filter genannt. Es handelt sich um Metalloxide, die das UV-Licht vor allem durch Reflexion und Streuung filtern. Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind Titandioxid (TiO_2) und Zinkoxid (ZnO). Sie sind biologisch und chemisch stabil und führen extrem selten zu Irritationen und phototoxischen oder photoallergischen Reaktionen [65]. Insbesondere beim Titandioxid können allerdings photokatalytische Wirkungen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Es handelt sich um weiße Pulver, die auch das sichtbare Licht streuen und auf der Haut weiß erscheinen. Durch die Reduktion der Größe wurden Partikel entwickelt, die das sichtbare Licht praktisch nicht streuen und vermehrt im UV-Bereich reflektieren und absorbieren [65]. Diese mikronisierten Partikel haben stark an Bedeutung gewonnen und sind heute in den meisten Sonnenschutzprodukten enthalten.

Da die Mikropartikel in Formulierungen leicht agglomerieren, werden sie mit Materialien wie z.B. Silikonen, Fettsäuren oder Aluminiumoxid beschichtet, um eine gleichmäßige Verteilung in der Formulierung zu erzielen. Zusätzlich wird dadurch einer potentiellen photokatalytischen Wirkung dieser Substanzen entgegengewirkt [29, 84, 88].

Organische und anorganische Filter werden in Sonnenschutzprodukten gewöhnlich kombiniert, um im kompletten Spektrum des ultravioletten Lichts zu filtern, die Nachteile der Einzelsubstanzen auszugleichen und die kumulativen Effekte auszunutzen [77].

Die photoprotektive Wirkung von Antioxidantien, z. B. Vitamin A, C und E oder Zink und Selen, beruht auf einem anderen Prinzip. Die Neutralisierung der von der UV-Strahlung hervorgerufenen toxischen Radikale verhindert die Schädigung der DNS. Für diese Substanzen konnte bisher noch kein substantieller UV-Schutz nachgewiesen werden. Sie werden allerdings trotzdem vielen Sonnenschutzprodukten zugesetzt, auch um die Inhaltsstoffe vor Oxidation zu bewahren [84].

Betakarotin wirkt ebenfalls als Antioxidans und hat bei täglicher Einnahme einer Dosis von 30 bis 100 mg eine deutlich nachweisbare protektive Wirkung [83].

Die gebräuchlichste Formulierung von Sonnenschutzmitteln ist die Öl-in-Wasser-Milch. Aber auch Wasser-in-Öl-Emulsionen, Hydrogels und Öle sind üblich. Insbesondere die Wasserfestigkeit wird von der Formulierung beeinflusst [83].

Entsprechend des Standards nach COLIPA wird empfohlen, Sonnenschutzmittel in der Konzentration von 2 mg/cm² aufzutragen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Lichtschutzmittel meist ungleichmäßig appliziert werden und dieser Standard nicht erreicht wird [4, 52, 58, 83].

Um die Effektivität von Sonnenschutzmitteln zu bewerten, wird der Lichtschutzfaktor (LSF) ermittelt. Man teilt die Zeit, die zur Erzeugung eines Erythems auf behandelter Haut benötigt wird, durch die entsprechende Zeit auf unbehauelter Haut. Diese Zeit wird unter standardisierten Bedingungen gemessen und Erythemschwelle oder mittlere Erythemdosis (MED) genannt [83].

$$LSF_{UVB} = \frac{MED_{\text{behandelte Haut}}}{MED_{\text{unbehandelte Haut}}}$$

Da der Lichtschutzfaktor sich auf die Erythembildung bezieht, ist er nur ein Maß für den Schutz gegen die UVB-Strahlung. Es sind verschiedene Verfahren entwickelt worden, um den UVA-Schutz zu bewerten, bisher gibt es dafür allerdings noch keinen Standard [80, 84].

Ein hoher Lichtschutzfaktor und ein sicherer Schutz im kompletten UV-Spektrum lässt sich ohne den Zusatz von Titandioxid nur schwer erreichen [77].

1.4 Titandioxid

Titandioxid (TiO₂) ist ein Metalloxid und kommt in der Natur meist als Anatas oder Rutil vor

[25, 33, 65]. Es ist ein unlösliches weißes Pulver und ist chemisch und biologisch stabil. Titandioxid wird seit ca. 60 Jahren in der Industrie als Farbpigment eingesetzt, vor allem in Farben, Papier, Kunststoff, Kosmetika, Pharmaka und Nahrungsmitteln (Lebensmittelfarbstoff E171) [10, 28]. Die Pigmente wurden also jahrelang so optimiert, dass sie für das sichtbare Licht möglichst wenig durchlässig sind, um besonders weiß zu erscheinen [10]. Die Lichtdurchlässigkeit ist abhängig von der Größe und der Form der Partikel [10]. Diese Farbpigmente haben Größen von ca. 180 - 250 nm [28]. Sie filtern zwar auch im UV-Bereich, sind aber in Sonnenschutzmitteln kosmetisch inakzeptabel, weil sie auf der Haut einen weißen Film hinterlassen [10]. Partikel mit Größen zwischen 10 und 100 nm und einer mehr nadelförmigen Struktur streuen das sichtbare Licht sehr reduziert und das UV-Licht im gesamten Bereich verstärkt [10, 28, 42, 65]. Diese Partikel werden in Sonnenschutzprodukten eingesetzt und haben erst in hohen Dosen einen weißenden Effekt [28]. Sie werden daher meist mit UV-Filtern kombiniert.

Titandioxid ist heute in den meisten Sonnenschutzprodukten enthalten. Es wird für seine guten Filtereigenschaften im gesamten UV-Bereich und seine Verträglichkeit geschätzt [17, 65]. Berichte über Nebenwirkungen sind selten, allerdings wird die kutane Exposition mit Hautpapeln [21], granulomatöser Entzündung und Fibrose in Zusammenhang gebracht [20]. Nach oraler und systemischer Gabe von Titandioxid konnte im Tierversuch keine Toxizität nachgewiesen werden [7, 8]. Über die Folgen inhalativer Exposition gibt es unterschiedliche Aussagen. Es wurde einerseits von Entzündungsreaktionen [19, 56, 64, 81], Oberflächenveränderungen der Alveolarmakrophagen [26] und der Induktion von Tumoren bei Ratten berichtet [34, 56]. Andererseits traten bei weiteren Untersuchungen diese Veränderungen nicht auf [59, 73, 76].

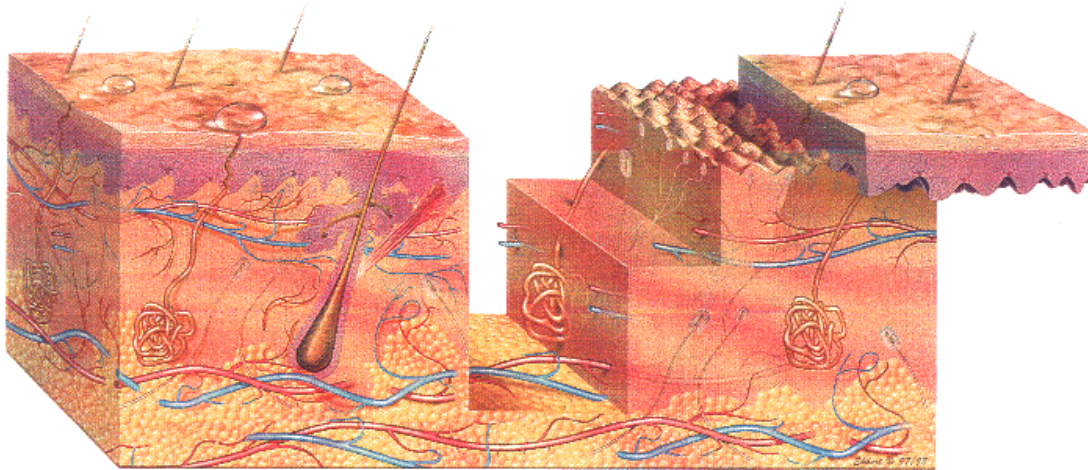
Es konnte gezeigt werden, dass Titandioxid in vitro proliferationshemmend auf menschliche Fibroblasten wirkt. Dieser Effekt trat auch bei beschichteten Partikeln auf [91]. Titandioxid wird wegen seiner photokatalytischen Eigenschaften z. B. zur Beseitigung organischer Verunreinigungen bei der Wasseraufbereitung verwendet [6]. Dieser photokatalytische Effekt hat ebenfalls Auswirkungen auf menschliche Zellen [11, 66, 91, 93]. Die Beschichtung der Partikel kann diese Wirkung drastisch reduzieren, aber nicht grundsätzlich verhindern [91].

Um die Relevanz der potentiellen Schädigungen für den Einsatz in Sonnenschutzmitteln beurteilen zu können, muss man wissen, mit welchen Strukturen der Haut die Partikel in Kontakt kommen und daher das Penetrationsverhalten von Titandioxid eingehender untersuchen.

1.5 Penetrationsmechanismen

Die Untersuchung des Penetrationsverhaltens topisch applizierter Substanzen ist die Grundlage für eine Optimierung ihrer Anwendung und der Reduzierung der Nebenwirkungen.

Die möglichen Penetrationsmechanismen lassen sich leicht nachvollziehen, wenn man sich den Aufbau der Haut vergegenwärtigt.



aus: Skin Care Forum, Ausgabe 20, März 1999. © Henkel KgaA, Care Chemicals, Düsseldorf

Abbildung 1: Der Aufbau der menschlichen Haut.

Die oberste Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, besteht aus kernlosen, abgestorbenen Keratinozyten, den Korneozyten. Sie trägt zur mechanischen Festigkeit bei und übernimmt den Hauptanteil der Barrierefunktion der Haut, schützt den Körper also vor allem gegen Austrocknung und das Eindringen von Substanzen von außen. Die Korneozyten werden an allen Seiten von einem Lipidfilm umgeben, wie Steine einer Mauer vom Mörtel. Diese Barriere wird nur von den Hautanhangsgebilden unterbrochen, den Haarfollikeln (mit Talgdrüsen) und den Schweißdrüsen. Sie reichen bis tief in die Dermis und stehen in Kontakt mit dem Gefäßsystem der Haut [14].

Der Penetrationsprozess entspricht der Diffusion einer Substanz in die Haut. Das ist in drei verschiedenen Formen denkbar und auch beschrieben worden.

1. Direkt durch die Korneozyten: Transzelluläre Penetration.
2. Entlang der Korneozyten in der Lipidschicht: Interzelluläre Penetration.
3. Entlang der Hautanhangsgebilde, insbesondere der Haarfollikel: Follikuläre Penetration [86].

Zusätzlich muss die Verteilung der Substanzen entlang der Hautoberfläche, das Spreiten, berücksichtigt werden.

Bisher ging man meist von flächiger Diffusion aus, denn die Hautanhangsgebilde nehmen nur 0,1% der Hautoberfläche ein. Zahlreiche Studien untersuchen inzwischen die follikuläre Penetration, deren überraschend großer Einfluss auf das Penetrationsverhalten nachgewiesen werden konnte [38].

Erwartungsgemäß penetrieren großmolekulare Substanzen oder Substanzen mit hohem Molekulargewicht schlechter. Auch besonders hydrophile (vor allem Salze) oder lipophile Stoffe dringen weniger in die Haut ein. Die Penetration von Substanzen ist stark abhängig von ihrem Vehikel. Sie kann z. B. durch Hitze, Okklusion und Lösungsmittel beschleunigt werden [86].

1.6 Penetrationsmessungen

Im Laufe vieler Jahre sind einige Methoden zur Penetrationsuntersuchung in der Literatur beschrieben worden und haben sich etabliert:

- Nachweis radioaktiver Substanzen in Exkrementen und Blut [41]
- Biopsien der Haut [39]
- Saugblasentechnik [24, 74]
- Abrissmethode [18, 70]
- Oberflächenwiedergewinnung von Substanzen [46]
- Biologische oder pharmakologische Reaktionen [90]
- Autoradiographie und Fluoreszenzmessungen [96]
- Penetrationsuntersuchungen mit Franz-Zellen [67]

Die qualitative und quantitative Penetration in vivo kann prinzipiell nur mit den vier zuerst genannten Methoden getestet werden. Der Einsatz radioaktiver Substanzen ist beim Menschen ethisch problematisch. Die Entnahme von Biopsien und das Setzen von Saugblasen hinterlässt Narben, daher sollte man den wissenschaftlichen Nutzen sorgfältig abwägen. Insbesondere für Untersuchungen der Penetrationskinetik, die mehrere Proben erfordern, kommen diese Methoden nicht in Frage.

Die Abrissmethode ist ein relativ einfaches und nicht-invasives Verfahren und sollte daher für die Versuche dieser Arbeit benutzt werden.

1.7 Abrissmethode

Die Abrissmethode ist eine Technik zur Untersuchung der Hornschicht. Diese wird sukzessive mittels Klebestreifen schichtweise abgetragen und die Tapes anschließend untersucht.

Sie wurde 1939 von Wolf das erste Mal beschrieben [95].

Die Methoden der Abrissentnahme, die geschildert wurden, variieren stark. Sie unterscheiden sich unter anderem durch den verwendeten Klebefilm, die Art des Andrückens, die Applikationsstelle und die Anzahl der entnommenen Abrisse [45, 57, 70].

Die Abrissmethode wird häufig für Penetrationsuntersuchungen benutzt. Wird die gemessene Substanzmenge zur Abrissnummer ins Verhältnis gesetzt, ergeben sich bestenfalls semiquantitative Aussagen.

Für quantitative Penetrationsuntersuchungen muss die Menge der Korneozytenaggregate auf den Abrissen ermittelt werden. Darüber hinaus ist für den interindividuellen Vergleich die Bestimmung der lokalen Position des Abrisses im Profil der Hornschicht nötig.

Es wurden verschiedene Methoden vorgeschlagen, das Hornschichtprofil durch das Abrissverfahren zu bestimmen:

Die klassische Methode ist die Gravimetrie, das Wiegen der Klebestreifen [18, 60, 94]. Sie hat den Nachteil, dass sie aufwendig und störanfällig ist. Es konnte gezeigt werden, dass das Gewicht durch Bestandteile, die man zusätzlich zu den Hornschichtpartikeln auf den Abrissen gefunden hat, wie z. B. Talg und Schweiß, verfälscht wird. Bei Penetrationsuntersuchungen erhöhen die topisch applizierten Substanzen das Gewicht besonders der ersten Abrisse. [51].

Eine weitere Technik ist die Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL). Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der entfernten Abrisse und dem Anstieg des TEWL gefunden [43]. Diese Vorgehensweise ist zwar unkompliziert, führt aber vor allem bei den ersten Abrissen zu einem relativ großen Messfehler [51].

Des weiteren kommen spektroskopische Verfahren zum Einsatz.

Martin et al. haben die UV-Absorption durch die Proteine in den Korneozyten bestimmt. Die Absorptionsbanden waren recht schwach und wurden durch andere Substanzen, wie z. B. Emulsionsbestandteile, überlagert [60].

Die Messung der Absorption spezifischer Korneozytenfärbungen auf den Abrissen ergab nur

unbefriedigende Korrelationen. Die Abrisse sind nach der Färbung für weitere Untersuchungen nicht mehr geeignet und die Bestimmung der Menge der applizierten Substanz nicht möglich [18].

Weigmann beschreibt ein Verfahren, das die optische Absorption von Korneozytenaggregaten im sichtbaren Spektralbereich (bei 430 nm) misst. Er konnte zeigen, dass zwischen dem Wiegen und der Absorptionsmessung der Abrisse eine sehr exakte Korrelation gegeben ist. Auch die Untersuchung behandelte Haut ist möglich, da die topisch applizierten Substanzen in der Regel im sichtbaren Spektralbereich keine Absorptionsbanden aufweisen [94].

So kann die relative Menge der Hornschicht auf den einzelnen Abrissen bestimmt und daraus ein Hornschichtprofil erstellt werden. Dazu wird die Extinktion durch die Korneozyten aufsummiert und auf die Extinktion der gesamten Hornschicht bezogen (100%). Das lässt einen Vergleich zwischen verschiedenen Probanden zu und ermöglicht reproduzierbare Ergebnisse, da die Zuordnung eines Abrisses zur Tiefe innerhalb des Hornschichtprofils gelingt. Diese Methode ist einfach zu handhaben und führt nicht zur Zerstörung der Abrisse, so dass sie für Folgeuntersuchungen weiterverwendet werden können.

Die inhomogene Verteilung der Korneozyten auf den Abrissen wird ausgeglichen durch die Wahl eines großen Messspots.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Abrissmethode die Korneozyten nicht vollständig entfernt [37], sondern dass Hornschuppen in den Furchen verbleiben [63].

Dieser Nachteil muss überwunden werden, wenn die Methode für quantitative Messungen eingesetzt werden soll. Das ist auch Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

1.8 Penetrationsverhalten von Titandioxid

Die Effekte und Nebenwirkungen von Sonnenschutzmitteln werden von den Herstellerfirmen ausführlich untersucht, um eine Zulassung der Filtersubstanzen zu erhalten. Weniger Informationen gibt es über das Penetrationsverhalten. Es ist wichtig, die Verteilung einer Substanz in der Haut zu kennen, da die Effizienz und das Ausmaß der Nebenwirkungen davon abhängen. Weiterhin wird die Wasserfestigkeit eines Sonnenschutzmittels entscheidend durch die Penetrationstiefe bestimmt.

Die ideale Lichtschutzsubstanz bildet nach dem Auftragen eine gleichmäßige dünne Schicht im obersten Teil des Stratum corneum. So hat sie keinen Kontakt mit den lebenden Zellen der Epidermis, wo Nebenwirkungen eintreten könnten, dringt aber doch tief genug ein, um nicht

durch normales Verhalten (Kontakt mit Textilien, Abtrocknen, Bewegung, evtl. Wasserkontakt) wieder entfernt zu werden.

Trotz des breiten Einsatzes von mikrofeinem Titandioxid ist das Penetrationsverhalten erst wenig untersucht worden.

Tan et al. haben 1996 anhand von Biopsien menschlicher Haut, die über mehrere Wochen mit Titandioxid behandelt worden war, zeigen können, dass die Dermis erhöhte Titandioxid-Konzentrationen aufwies. Daraus wurde geschlossen, dass Titandioxid bis in die Dermis penetriert. Diese Studie weist einige Limitationen auf [89].

Castiel-Higuonenc publizierte 1995 die Ergebnisse ihrer In-vitro-Untersuchungen an Diffusionszellen zur Penetration von Titandioxid in menschliche Haut. Es fand sich kein Titandioxid in der Rezeptor-Flüssigkeit. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde Titandioxid nur in den obersten Lagen der Hornschicht gefunden [12].

Letzteres bestätigten Untersuchungen von Dussert und Hemmerle [22, 35].

Lansdown kam im Tierversuch am Hasen ebenfalls zum gleichen Ergebnis. Zusätzlich weist er auf Reste von Titandioxid in den äußeren Anteilen der Haarfollikel hin [54].

1.9 Ziele und Problemstellungen

Die bisherigen Untersuchungen zur Penetration von Titandioxid sind offensichtlich nicht ausreichend. Es gibt unterschiedliche Angaben zur Penetrationstiefe von Titandioxid. Nur in den Studien von Tan et al. ist die Substanz über mehrere Tage appliziert worden, die anderen beschriebenen Versuche wurden nach einmaliger Applikation von Titandioxid durchgeführt. Die weitere Penetrationskinetik über mehrere Tage wurde nicht beachtet. Der Einfluss verschiedener Beschichtungen auf das Penetrationsverhalten ist nicht bekannt. In den bisherigen Untersuchungen wurde von flächiger Penetration ausgegangen. Die Rolle der Hautanhangsgebilde für die Penetration von Titandioxid ist noch unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragen geklärt werden:

1. Penetriert Titandioxid in die Haut und wenn ja, wie tief?
2. Wie ist die Penetrationskinetik über mehrere Tage?
3. Welchen Einfluss haben unterschiedliche Beschichtungen auf das Penetrationsverhalten?
4. Welche Penetrationswege sind relevant? Welche Rolle spielen die Follikel?

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Emulsion

Die Emulsion für die Versuche wurde freundlicherweise von der Firma L'Oréal (Paris) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine Öl in Wasser Emulsion, welche in kommerziellen Produkten Anwendung findet. In diese Emulsion wurden jeweils zwei unterschiedliche Formen von Titandioxid-Mikropartikeln eingebracht. Die Emulsion ohne die Partikel soll im weiteren Basis-Emulsion genannt werden.

2.1.2 Titandioxid-Mikropartikel

Die Partikel unterscheiden sich in der Form der Titandioxidkristalle und durch die Art ihrer Beschichtung. Die Konzentration der Partikel in der Emulsion beträgt jeweils 5%. Kommerzielle Sonnenschutzmittel enthalten im Allgemeinen etwa 3%, teilweise jedoch bis zu 10%.

UV-Titan M 160

Dem Produktdatenblatt der Firma Kemira (Finnland) zufolge handelt es sich bei diesen Partikeln um beschichtete, rutil Titandioxidkristalle. Eine kontrollierte Partikelgrößenverteilung führt zu einer ausgezeichneten Dispergierbarkeit. Das spezifische Gewicht der Partikel beträgt ca. 4, der TiO_2 -Gehalt mindestens 77%. Die Beschichtung setzt sich aus Stearinsäure (7,1%), Aluminiumoxid (6,3%) und Siliziumoxid (0,2%) zusammen.

Nach Auskunft der Firma Kemira sind die Partikel hydrophob. Die Partikelgröße beträgt ca. 200 nm und der Durchmesser der Beschichtung ca. 0,2 nm.

In vorausgehenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass diese Partikel nach Anregung fluoreszieren und bei 255 nm eine deutliche Absorptionsbande besitzen. Da Titandioxid nicht fluoresziert, muss einer der weiteren Bestandteile dafür verantwortlich sein.

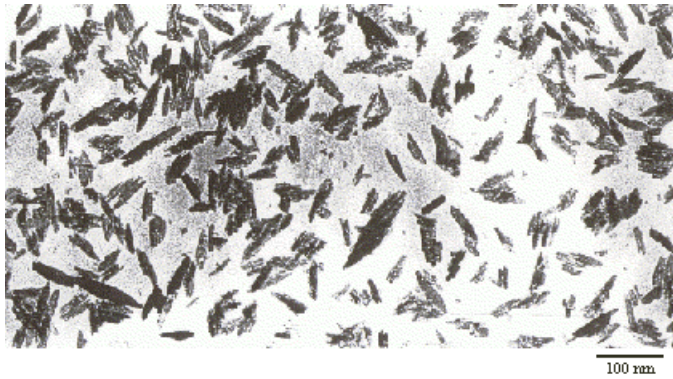


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der primären rutilen Kristalle.

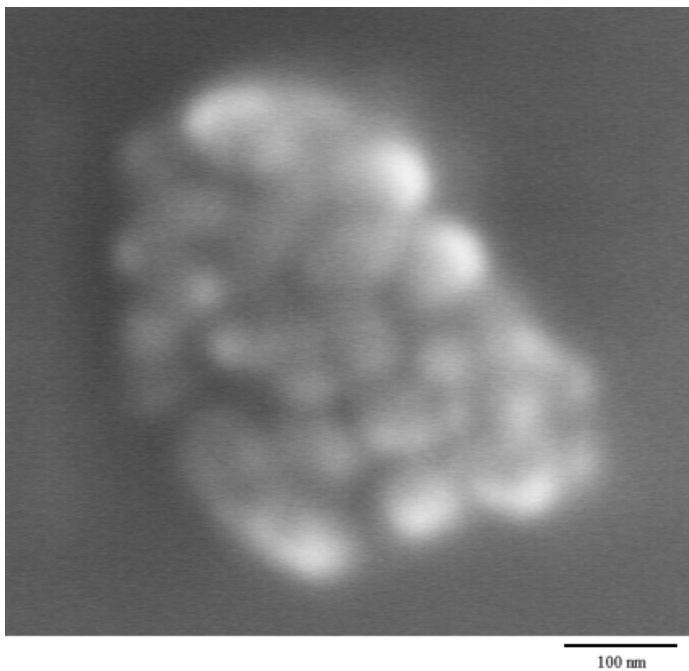


Abbildung 3: Untersuchung der Titandioxid-Mikropartikel (in Emulsion) unter dem Rasterelektronenmikroskop.

Tioveil AQ-N

Die Grundlage der anderen Titandioxid-Partikel der Firma Tioxide Specialities LTD (England) sind ebenfalls rutil Kristalle. Die Firma L'Oréal beschreibt diese Partikel wie folgt: Die Größe der Partikel schwankt zwischen 10 und 150 nm, der Anteil an Titandioxid beträgt 74%. Die Beschichtung besteht aus Silizium, Aluminium und Natriumpolyacrylat.

2.1.3 Tesafilm

Der beim Abrissverfahren verwendete Klebefilm TESA Film No. 5529 wird von der Firma Beiersdorf (Hamburg, Deutschland) in der Breite 19 mm hergestellt. Er wurde unter mehreren Klebefilmen ausgewählt, da er eine hohe UV-Transparenz und eine sehr homogene Belegung der Klebeschicht aufweist. Weiterhin enthält dieser Klebefilm keine störenden absorbierenden Inhaltsstoffe im UVA- und UVB-Bereich.

2.1.4 Osmiumtetroxid

Die Färbemethode mit Osmiumtetroxid wird neben der Färbung mit Sudanfarbstoffen eingesetzt zum Nachweis apolarer Lipide [23] und sollte darum geeignet sein, Follikelausgänge zu markieren. Sie ist von Adams 1959 beschrieben worden [1].

Lipide werden durch Einwirken von Osmiumtetroxidlösungen auf das Gewebe geschwärzt, was auf Anlagerung an die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren zurückzuführen ist [9].

Verwendet wurde Osmium(VIII)-oxid (0,1g) der Firma Merck in 0,1%iger wässriger Lösung.

2.2 Probanden

Die Probanden wurden unter dem Gesichtspunkt ausgewählt, dass die Haut auf dem Unterarm weitgehend unbehaart war und keine Narben aufwies.

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 4 Probanden durchgeführt, welche in Tabelle 3 charakterisiert sind.

Tabelle 3: Übersicht über die Probanden

	Zuordnung zu den Versuchen	Alter	Geschlecht	Hauttyp
Proband 1	Biopsie ohne Titandioxid	23	m	II-III
Proband 2	Abrissserien an beiden Armen	24	m	III
Proband 3	Abrissserie & TiO ₂ -Biopsie	19	m	III
Proband 4	Färbung mit Osmiumtetroxid	26	w	II-III

2.3 Abrissmethode

Die Penetrationsuntersuchungen erfolgten mit Hilfe der Abrissmethode in Kombination mit

spektroskopischen Messungen zur Bestimmung der Korneozytenmenge auf den einzelnen Abrissen. Diese Methode soll hier ausführlich beschrieben werden.

Grundsätzlich gliedert sich der Arbeitsablauf der Penetrationsuntersuchung mit Hilfe der Abrissmethode in folgende Abschnitte:

- Ermitteln der Emulsionsmenge
- Applikation der Emulsion
- Entnahme der Abrisse
- Spektroskopische Messung der Extinktion der Hornschuppen auf den Abrissen
- Berechnen des Hornschichtprofils
- Messung der Konzentration der Substanz auf den Abrissen
- Erstellen des Penetrationsprofils

Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse sind standardisierte Messprotokolle. Im Folgenden werden solche Standards beschrieben, die in den Versuchen der Arbeit angewendet wurden. Auf eine Abwandlung wird explizit hingewiesen.

2.3.1 Ermitteln der Emulsionsmenge

Die Emulsion wurde dem COLIPA-Protokoll (US-Standard) entsprechend in der Konzentration 2 mg/cm^2 aufgetragen. Die Applikation der Emulsion erfolgte mit Hilfe einer Standardspritze, um ein einfaches Abmessen und eine möglichst gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Dazu musste die Masse der Emulsion pro Volumeneinheit ermittelt werden. Es wurde eine Präzisionswaage (BP 211D-OCE; Sartorius, Deutschland) verwendet.

2.3.2 Applikation der Emulsion

Die Emulsion wurde nach dem folgendem Schema aufgetragen.

Tabelle 4: Applikationsprotokoll

1.	Abmessen und Anzeichnen der Applikationsfläche.
2.	Ermittlung der benötigten Emulsionsmenge.
3.	Applikation der Emulsion.
4.	Verreiben der aufgetragenen Menge mit einem gesättigten Gummifingerling.

1. Auf dem Unterarm des Probanden wurde eine möglichst große Fläche ausgewählt (ca. 100 cm²) und mit einem Derma-Marker angezeichnet. Er wurde vorher untersucht und dabei gesichert, dass der enthaltene Farbstoff im betrachteten Bereich nicht absorbiert. Je größer die Fläche für die Applikation der Emulsion gewählt wird, desto größer ist die aufzutragende Menge. Dadurch kann die Haut homogener eingecremt und auch der Fehler beim Aufziehen der Emulsion in die Spritze verringert werden.
2. Die benötigte Menge Emulsion wurde wie oben beschrieben ermittelt und auf eine Einmalspritze aufgezogen.
3. Die Emulsion wurde mit der Spritze möglichst gleichmäßig auf die abgemessene Fläche getupft (Abbildung 4).
4. Anschließend wurde die Emulsion mit einem ungepuderten Fingerling gleichmäßig verrieben.

Der Proband wurde angewiesen, die Emulsion eine Stunde lang einwirken zu lassen. Das bedeutete, dass er die Applikationsstelle in dieser Zeit nicht mit Textilien bedecken durfte, jede Berührung dieser Stelle mit anderen Dingen vermeiden und sich möglichst wenig bewegen sollte, auch um Transpiration zu vermeiden.

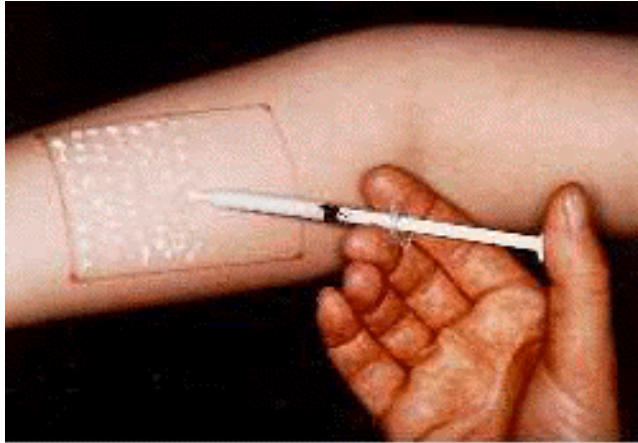


Abbildung 4: Applikation der Emulsion.

2.3.3 Entnahme der Abrisse

Im folgenden werden die einzelnen Schritte des Abrissverfahrens im Detail beschrieben.

Tabelle 5: Protokoll des Abrissverfahrens

1.	Tesafilm aufkleben
2.	Abdecken mit Papier
3.	Andrücken (Abbildung 5)
4.	Abreißen des Tesafilmstreifens (Abbildung 6)
5.	Lagern des Abrisses
	Wiederholen von Schritt 1-5, bis die Transmission nahezu 100% beträgt
6.	Kontrolle mit dem Spektrometer und unter dem Mikroskop

1. Der Unterarm wurde mit der Streckseite auf eine stabile Unterlage gelegt. Ein Tesafilmstreifen wurde vorsichtig quer über das markierte Feld auf die Haut der Unterarmbeugeseite aufgeklebt. Die Position wurde beim ersten Mal vorsichtig durch Farbpunkte außerhalb des angezeichneten Feldes markiert. Die folgenden Streifen wurden auf exakt diese Fläche geklebt und dadurch auch ihre Länge definiert.
2. Ein sauberer Papierstreifen wurde so über den Tesafilmstreifen gelegt, dass er vollständig abgedeckt war. Dadurch sollte die Kontamination und Verschmutzung der

Rückseite des Abrisses beim Rollen vermieden werden. Für jeden Abriss wurde ein neuer Papierstreifen verwendet.

3. Der Untersucher fuhr mit einer Rolle (Abbildung 5) mit starkem, gleichbleibendem Druck längs in beide Richtungen je 5x über den abgedeckten Tesafilmstreifen. Danach wurde der Papierstreifen entfernt.
4. Der Tesafilmstreifen wurde anschließend vorsichtig an einem Ende gefasst und mit einer schnellen Bewegung von der Haut abgerissen.
5. Der Klebestreifen wurde auf einem Metallring mittig aufgeklebt und die Abrissnummer mit einem Marker auf den Ring geschrieben.

Diese Schritte wurden wiederholt, bis in simultan zur Abrissserie durchgeführten spektrometrischen Probemessungen die Transmission nahezu 100% war. Das wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, um sicherzustellen, dass praktisch keine Hornschuppen mehr entfernt wurden.

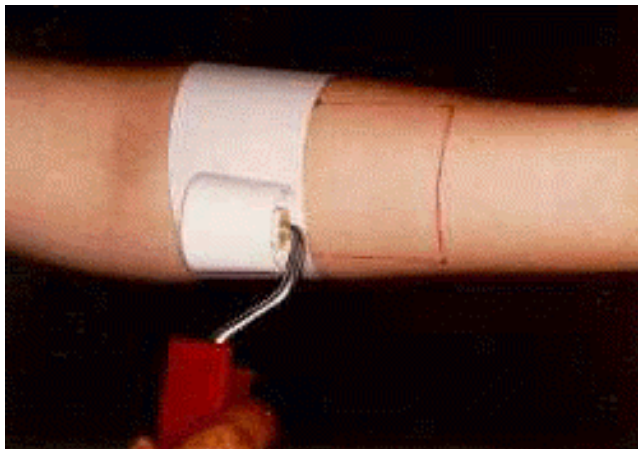


Abbildung 5: Anpressen des Tesafilmstreifens durch gleichmäßiges Überfahren mit einer Rolle über Papier.

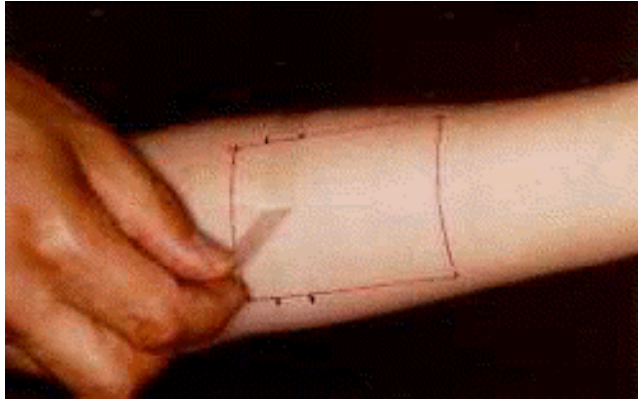


Abbildung 6: Abreißen des Tesafilmstreifens.



Abbildung 7: Entnahmestelle nach dem Abrissverfahren.

2.3.4 Spektroskopische Messung der Extinktion der Hornschuppen auf den Abrissen

Zur Ermittlung des Hornschichtprofils wurden die Abrisse bei 430 nm im Zweistrahlphotometer gegen einen Leerstreifen vermessen. Dafür wurde ein modifiziertes Lambda 20 UV/VIS Spektrometer von Perkin Elmer (Überlingen) verwendet. Die Fläche des Messspots betrug 1 cm².

Das Signal wird durch Streuung, Reflexion und Absorption der Korneozyten hervorgerufen. Im Bereich ab 400 nm kann der Einfluss der Emulsion auf die Extinktion vernachlässigt werden.

Prinzipiell könnte aber auch bei jeder Wellenlänge gemessen werden, bei der das Signal nicht durch die Absorption der Emulsion gestört wird. Für organische Sonnenschutzmittel konnte gezeigt werden, dass dieses außerhalb der UV-Absorptionsbande der Filtersubstanzen (z. B. sichtbarer Spektralbereich) möglich ist [2].

Die Titandioxid-Mikropartikel reflektieren auch im sichtbaren Bereich, so dass das gemessene Signal eine Überlagerung der Streuung der Korneozyten und der Titandioxid-Mikropartikel darstellt. Daher war es nicht möglich, das Hornschichtprofil aus Proben zu bestimmen, die von mit Titandioxid behandelten Haut stammten. Deshalb musste das Hornschichtprofil für dieselbe Emulsion ohne Titandioxid an einem analogen Hautareal bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl der Größe und der Lage des Hautareals am Unterarm keinen Einfluss auf das Hornschichtprofil hat [2].

2.3.5 Berechnen des Hornschichtprofils

Das Hornschichtprofil soll abgerissene Hornschicht möglichst realitätsnah darstellen.

Es wird ein Koordinatensystem mit zwei Ordinaten erstellt. Auf der linken werden die aufsummierten Extinktionen der Korneozyten in Prozent aufgetragen (bei 430 nm), der oberste Wert ist 0% und der Schnittpunkt mit der Abszisse sind 100%.

Die Funktion

$$f(k) = \frac{\sum_{i=1}^k E_i \cdot 100\%}{\sum_{j=1}^n E_j}$$

bestimmt die aufsummierte Extinktion bis zur Abrissnummer k in Prozent. Hierbei ist E_x die Extinktion des Abrisses x, und n die Anzahl aller Abrisse.

Diese Prozentwerte werden als horizontale Linien in das Koordinatensystem eingetragen. Das Hornschichtprofil wird durch eine waagerechte Linie beim Wert 0 nach oben abgeschlossen. Diese Linie entspricht optisch der Hautoberfläche.

Die entstehenden Balken stellen die Dicke der Korneozytenschicht auf dem entsprechenden Abriss dar. Sie werden auf der rechten Abszisse bei 1 beginnend von oben durchnummeriert, was den Abrissnummern entspricht. Ein Beispiel ist in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Beispiel für ein Hornschichtprofil.

2.3.6 Messung der Konzentration der Substanz auf den Abrissen

Die Röntgenfluoreszenzanalyse ist die Standardmethode zur Bestimmung kleinster Konzentrationen von metallischen Elementen und daher auch gut geeignet, um geringste Mengen Titandioxid nachzuweisen. Die Messungen wurden in der IUT GmbH (Berlin) unter Verwendung eines EX 1,000 Röntgen-Spektrometers durchgeführt.

Aus der Mitte der Abrisse wurde 1 cm^2 des korneozytenbesetzten Tesafilmstreifens mit einem Skalpell entnommen. Die Ränder wurden großzügig ausgespart. Diese Ausschnitte wurden in Chlornitratsäure unter Mikrowellenbestrahlung aufgelöst und Iridium als interner Standard hinzugefügt. Zwei Milliliter der Lösung wurden auf eine Quarzplatte getropft, dann mit quantitativen Röntgenfluoreszenzmessungen untersucht und die Titankonzentration der Abrisse bestimmt.

2.3.7 Erstellen des Penetrationsprofils

Die Titankonzentrationen der untersuchten Abrisse werden als waagerechte Balken in das Hornschichtprofil eingetragen. Dadurch entsteht das Penetrationsprofil (Abbildung 9).

Zur besseren Veranschaulichung werden die Balken zentriert, der Wert 0 liegt in der Mitte der X-Achse. Die Skala ist nur in eine Richtung abzulesen, bezieht sich aber auf die ganze Länge des Balkens.

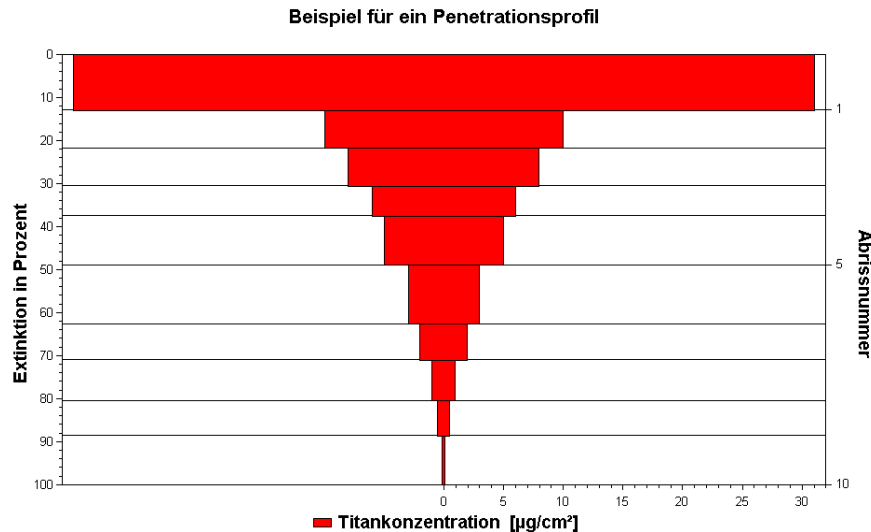


Abbildung 9: Beispiel für ein Penetrationsprofil

2.4 Erster Teil der Versuche: Penetration

2.4.1 Vorversuch: Überprüfung des Abrissverfahrens

Damit die Abrissmethode zur Erstellung des Penetrationsprofils eingesetzt werden konnte, musste gezeigt werden, dass die Hornschicht vollständig entfernt wird. Nur so konnten Hornschicht- und Penetrationsprofil als Grundlage für weitere Betrachtungen dienen.

Für diese Untersuchungen wurden einem Probanden zwei Biopsien entnommen, um die vollständige Entfernung des Stratum corneum mit Hilfe der Abrissmethode nachzuweisen.

An der rechten Unterarmbeugeseite des Probanden wurde die Basis-Emulsion wie beschrieben aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde wurde das Abrissverfahren durchgeführt, bis der Tesafilmstreifen keine Korneozytenaggregate mehr enthielt. Gleich im Anschluss wurden die Biopsien entnommen, eine in dem Hautareal, in dem die Abrisse entfernt wurden und eine weitere relativ dicht daneben, in dem mit Emulsion behandelten Gebiet. Dazu wurden 3 mm Stanzen verwendet.

Die Biopsien wurden in Paraffin fixiert, in der Histopathologie der Hautklinik der Charité mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und histologische Schnitte (5 µm) erstellt.

2.4.2 Versuch: Langzeitpenetration verschiedener Titandioxid-Partikel

Die Untersuchungen zur Langzeitpenetration von Titandioxid wurden nach dem beschriebenen Verfahren mit Hilfe der Abrissmethode, spektroskopischen Messmethoden und Röntgenfluoreszenzmessungen durchgeführt. Sie sollten zunächst Aufschluss darüber geben, ob nach mehrfacher Applikation von titandioxidhaltiger Emulsion, ähnlich den realen Bedingungen während des Urlaubs am Meer, im unteren Teil der Hornschicht Titandioxid nachweisbar ist. Zugleich wurden die Veränderungen dieser Konzentrationen über mehrere Tage nach der letzten Applikation beobachtet. Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Titandioxidpartikeln an zwei Probanden durchgeführt. Bei einem Probanden wurden beide Titandioxid-Emulsionen an je einem Arm aufgetragen. So konnten orientierende Aussagen über den Einfluss der Partikelbeschaffenheit und über interindividuelle Unterschiede gemacht werden.

Die Applikation der Emulsion und die Entnahme der Abrisse erfolgte nach dem Protokoll der Tabelle 6. Die Probanden durften die Applikationsstelle über die ganze Zeit (Applikation und Abrissserien) nicht waschen. Die Stelle konnte aber tagsüber nach einer Einwirkphase von einer Stunde mit Textilien abgedeckt werden, ebenso nachts.

Die Abrisse wurden nach dem standardisierten Verfahren entnommen, jede Abrissserie von nebeneinanderliegenden Stellen der mit Emulsion behandelten Fläche. Es wurde darauf geachtet, die später zu untersuchenden Areale nicht zu berühren, auch nicht mit den aufgelegten Papierstreifen.

Tabelle 6: Applikationsschema und Zeitpunkte der Abrissserien.

	8 Uhr		11 Uhr	14 Uhr	17 Uhr	20 Uhr
1. Tag	x		x	x	x	x
2. Tag	x		x	x	x	x
3. Tag	x		x	x	x	x
4. Tag	x	9 Uhr: Beginn der 1. Abrissserie				
5. Tag	8 Uhr: 2. Abrissserie					
6. Tag	-					
7. Tag	-					
8. Tag	8 Uhr: 3. Abrissserie					

x = Applikation der Emulsion

Zur Erstellung des Hornschichtprofils konnten die Abrisse mit Titandioxidpartikeln nicht verwendet werden, da die Extinktion der Korneozyten durch die Streuung der Partikel verfälscht wurde.

Daher wurde eine Woche vorher nach dem gleichen Applikationsschema die Basis-Emulsion auf eine separate Stelle aufgetragen und nach dem oben beschriebenen Plan auch die erste Abrissserie durchgeführt.

2.5 Zweiter Teil der Versuche: Penetrationswege

Zusätzlich zur qualitativen Untersuchung des Penetrationsverhaltens von Titandioxid war zu klären, welche Wege dafür eine Rolle spielen. Insbesondere den Einfluss der Haarfollikel war zu untersuchen. Dazu wurden einerseits die Positionen der Follikelöffnungen auf den Abrissen und andererseits der komplette Follikelkanal in einer Biopsie betrachtet.

2.5.1 Erster Vorversuch: Detektion der Follikelöffnungen auf den Abrissen

Um die Positionen der Follikelöffnungen auf den Abrissen zu untersuchen, musste eine Methode gefunden werden, diese Areale sichtbar zu machen.

Die Färbung mit Osmiumtetroxid ist neben der Fettfärbung mit Sudanfarbstoffen eine Methode für den Lipid-Nachweis. Osmiumtetroxid ist fettlöslich und bildet schwarze Reaktionsprodukte durch Anlagerung an Kohlenstoffdoppelbindungen.

Neben dem Haar befindet sich im Follikelkanal vor allem Talg, der von den assoziierten Talgdrüsen produziert wird. Talg besteht zu einem großen Teil aus Lipiden. Es sollte also versucht werden, die Follikelöffnungen auf den Abrissen mit Osmiumtetroxid zu markieren.

Drei Stunden vor dem Beginn der Abrissserie wurde nach der standardisierten Methode auf ein definiertes Areal eines Unterarms titandioxidhaltige Emulsion (UV-Titan) aufgetragen. In der Zwischenzeit hatte der Proband den Arm nicht abgedeckt und sich so wenig wie möglich bewegt, um ein gleichmäßiges Einwirken zu ermöglichen und ein Verwischen zu vermeiden.

Die Abrissmethode wurde variiert, indem die Tesafilmstreifen, die angefärbt werden sollten, vor dem Abreißen 10 Minuten auf der Haut belassen wurden. Damit sollte erreicht werden, dass die typischen Substanzen aus den Follikelöffnungen in die Klebeschicht des Tesafilmstreifens diffundieren und so eine intensive Färbung initiieren.

Die Versuche mussten mit größter Vorsicht unter dem Abzug ausgeführt werden. Es wurden Handschuhe getragen, um eine Kontamination mit dem giftigen Osmiumtetroxid zu vermeiden.

Tabelle 7: Färbemethode mit Osmiumtetroxidlösung.

1.	Lagern des Tesafilmstreifens in einer Petrischale.
2.	Auftropfen von Osmiumtetroxidlösung mit einer Pipette.
3.	Verteilen der Osmiumtetroxidlösung durch Bewegung der Petrischale. Sollte damit keine ausreichende Verteilung erzielt werden, wird ein Spatel verwendet, ohne den Streifen selbst zu berühren.
4.	Reicht die Menge der Osmiumtetroxidlösung nicht, um den Streifen völlig zu bedecken, muss zusätzlich Lösung aufgetropft und verteilt werden.
5.	Trocknen der Tesafilmstreifen unter dem Abzug.
6.	Eine Stunde warten.
7.	Zweimaliges Spülen der Tesafilmstreifen mit destilliertem Wasser.
8.	Erneut trocknen lassen.

2.5.2 Zweiter Vorversuch: Detektion der Partikel mit Laser-Scan-Mikroskopie

Orientierende Untersuchungen mit einem Fluoreszenzspektrometer hatten ergeben, dass die Titandioxidpartikel (UV-Titan) im Bereich 600-680 nm fluoreszieren. Damit war die prinzipielle Möglichkeit gegeben, die Partikel unter dem Laser-Scan-Mikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argonlaser) nachzuweisen. Da das Titandioxid keine Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich besitzt, war anzunehmen, dass eine Substanz der Beschichtung für das beobachtete Signal verantwortlich ist.

Erste LSM-Untersuchungen wurden durchgeführt, um die getroffene Zuordnung der beobachteten Fluoreszenz zu den Titandioxid-Partikeln zu bestätigen.

Für die Messungen wurde ein Argonlaser der Firma Lambda Physik GmbH (Göttingen, Deutschland) und ein Laser-Scan-Mikroskop von der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) vom Typ LSM 2000 verwendet.

Eine kleine Menge der Titandioxidpartikel wurde auf einen Probenträger aufgebracht und am Laser-Scan-Mikroskop untersucht. Da Titandioxid reflektiert, sind die Partikel durch die Messung der Reflexion darstellbar. In einem ausgewählten Bereich wurden zum Vergleich Reflexions- und laserinduzierte Fluoreszenzmessungen durchgeführt und die Ergebnisse verglichen.

2.5.3 Versuch: Ortsaufgelöster Nachweis der Partikel auf den Abrissen

Die Verteilung der Titandioxidpartikel sollte auf den mit Osmiumtetroxid gefärbten Abrissen durch Messungen am LSM untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Abschnitte mehrerer Abrisse unter dem Laser-Scan-Mikroskop betrachtet. Besonderes Augenmerk richtete sich dabei auf die mit Osmiumtetroxid gefärbten Follikelöffnungen.

Das jeweilige Gebiet wurde mit dem Argonlaser (488 nm) bestrahlt und sowohl die Fluoreszenz als auch die Transmission in Überlagerung aufgenommen.

Die Ergebnisse sollten mit Hilfe der ortsaufgelösten Raman-Spektroskopie, welche den direkten Titandioxidnachweis ermöglicht, verglichen werden. Dazu wurde ein Raman-Spektrometer 2000 R der Firma Perkin Elmer verwendet. Der Messstrahl hatte einen Durchmesser von 0,5 nm. Nach Anregung mit dem Laserstrahl wurde das Ramanfluoreszenzspektrum in der Spektralregion von 3500 cm^{-1} bis 100 cm^{-1} gemessen.

2.5.4 Versuch: Nachweis der Follikelpenetration durch eine Biopsie

Zur weiteren Untersuchung der Follikelpenetration von Titandioxid sollte eine Biopsie entnommen werden, in der ein vollständiger Follikel enthalten ist, um den Titangehalt bis in die Tiefe zu verfolgen.

Die Emulsion (UV-Titan) wurde entsprechend dem Protokoll der Langzeitapplikation der quantitativen Penetrationsuntersuchungen aufgetragen. Eine Stunde nach der letzten Applikation wurden 10 Abrisse entfernt. Gleich im Anschluss wurde eine 3mm-Stanz-Biopsie entnommen, fixiert und in der Pathohistologie der Hautklinik der Charité aufbereitet. Die Probe wurde in 10 Mikrometer dünne Kryo-Schnitte geteilt. Dabei wurde darauf geachtet, von der Tiefe zur Hautoberfläche zu schneiden, um keine Partikel in die Tiefe zu verschleppen. Schon während der Prozedur des Schneidens wurden die einzelnen Schnitte untersucht, ob sie einen Follikelkanal enthalten. Ab dem Beginn des Follikels wurden die Schnitte sukzessive in 3 Kategorien eingeteilt, die mit unterschiedlichen Verfahren aufbereitet wurden:

1.Serie: Der jeweils erste Schnitt wurde auf einen Probenträger aus Glas fixiert und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um die Gewebestrukturen und die Position des Follikels lichtmikroskopisch deutlich sichtbar zu machen.

2.Serie: Der jeweils zweite Schnitt wurde nicht gefärbt und war für Fluoreszenzmessungen unter dem Laser-Scan-Mikroskop vorgesehen.

3.Serie: Der jeweils dritte Schnitt wurde mit Gold bedampft und elektronenmikroskopisch mit Röntgenfluoreszenzmessungen untersucht, um die Verteilung des Titandioxid in der Probe zu ermitteln.

Diese Methode ist wesentlich empfindlicher als die Fluoreszenzmessungen unter dem Laser-Scan-Mikroskop.

3 ERGEBNISSE

3.1 Erster Teil der Versuche: Penetration

3.1.1 Vorversuch: Überprüfung des Abrissverfahrens

Ziel des Vorversuches war es zu prüfen, ob es mit Hilfe des Abrissverfahrens möglich ist, die Hornschicht komplett zu entfernen.

Während und nach der Durchführung der Abrissserie konnten folgende Beobachtungen gemacht werden.

- Im konkreten Fall wurden 92 Abrisse benötigt, bis die Klebestreifen praktisch frei von Korneozyten waren.
- Die Haut begann sich nach ca. 20 Abrissen zu röten und anzuschwellen.
- Nach ca. 30 Abrissen traten punktförmig glänzende Stellen auf, die sich ausbreiteten und nach und nach über die ganze Fläche verteilten und miteinander verschmolzen.
- Nach der Beendigung der Abrissserie war die Haut stark gerötet, glänzend und erhaben (Abbildung 10).



Abbildung 10: Unterarm nach dem Abrissverfahren und den beiden Biopsien.

Die Biopsie der unbehandelten Haut zeigte in der HE-Färbung ein typisches Gewebe der Epidermis und Dermis des Unterarms. Die Furchung der Epidermis ist deutlich zu erkennen (Abbildung 11).

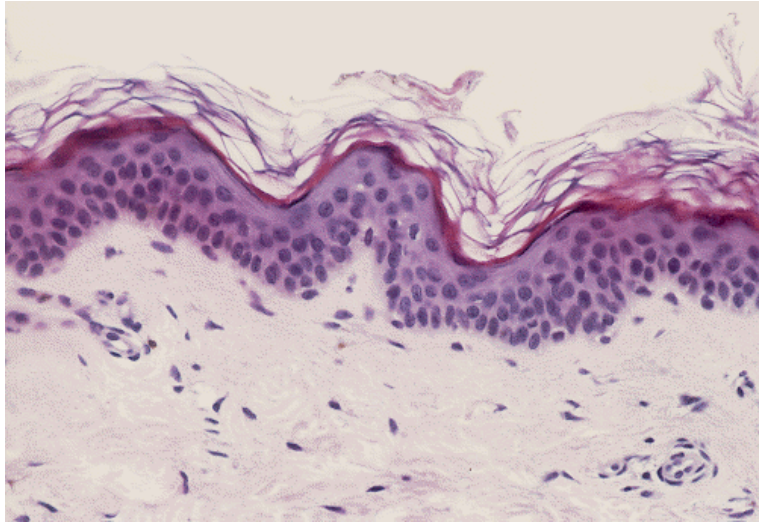


Abbildung 11: Biopsie der Haut des Unterarms außerhalb des Abrissareals.

Ein Vergleich mit der Biopsie, welche nach dem Abrissverfahren entnommen wurde, zeigt eine deutliche Schwellung der Haut an der Entnahmestelle. Die Falten und Furchen der Epidermis sind nicht mehr zu erkennen und das Gewebe ist deutlich heller, als Zeichen für ein Ödem. Es sind keine Hornschuppen über der Epidermis zu sehen (Abbildung 12).

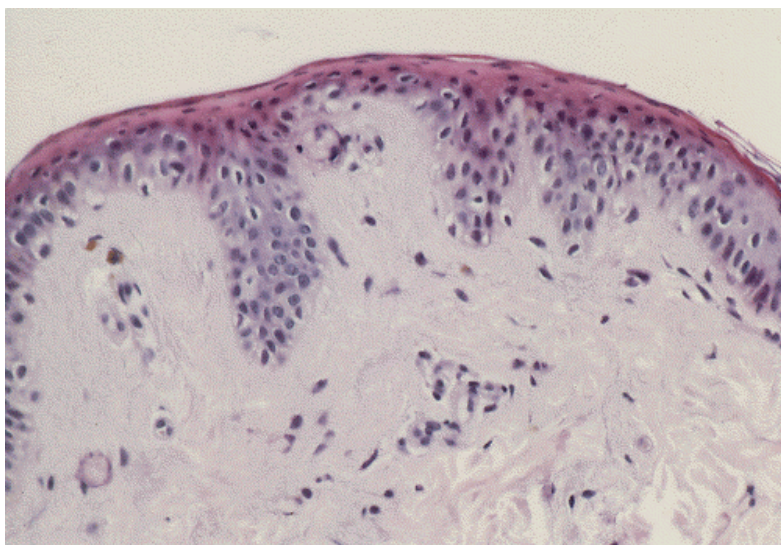


Abbildung 12: Biopsie der Haut des Unterarms nach der Entnahme von 92 Abrissen.

3.1.2 Versuch: Langzeitpenetration verschiedener Titandioxid-Partikel

1. Versuchsreihe: UV-Titan-Penetration (Proband 2, rechter Arm)

Zur Überprüfung des Penetrationsverhaltens von Titandioxid ins Stratum corneum wurde der rechte Arm des Probanden 2 mit der Emulsion behandelt, die die Partikel UV-Titan enthält. Anschließend wurde das Abrissverfahren durchgeführt und die Tesafilmstreifen untersucht.

In Abbildung 13 sind die dazugehörigen Penetrationsprofile zu sehen. Das Hornschichtprofil ist unauffällig und entspricht der Norm.

Bedingt durch die hohen Kosten der extern durchgeführten Röntgen-Fluoreszenz-Messungen wurden nur ausgewählte Abrisse untersucht (Tabelle 8).

Ein Großteil der Substanz ist im Profil nach einer Stunde im obersten Viertel lokalisiert. Die Substanzmenge pro Abriss nimmt zwischen dem zweiten und 10. Abriss rasch ab (entspricht ca. den obersten 25% der Hornschicht) und danach langsamer.

Der letzte Abriss, bei dem die Menge an Substanz untersucht wurde, war der 70. Auch hier konnte Titandioxid nachgewiesen werden, allerdings in minimalen Mengen nahe der Nachweisgrenze.

Im Profil nach 24 Stunden ist die Substanzmenge in den oberen Hornschichtlagen stark reduziert, auch in den unteren Schichten ist eine leichte Verminderung sichtbar.

Nach 96 Stunden erkennt man in allen Schichten nur noch minimale Substanzmengen, allerdings in den oberen Schichten immer noch mehr als in den unteren. Auch im 70. Abriss sind noch Spuren von Titandioxid zu finden.

2. Versuchsreihe: Tioveil-AQ-N-Penetration (Proband 2, linker Arm)

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Beschichtung der Partikel auf das Penetrationsverhalten von Titandioxid hat, wurde zum Vergleich simultan der linke Arm des Probanden mit einer anderen Substanz behandelt.

Das Penetrationsprofil vom linken Arm des Probanden 2 (Abbildung 14) zeigt ein ähnliches Bild wie das Profil des rechten Armes. Die Konzentration der Substanz in den oberen Schichten ist im Profil nach einer Stunde ein wenig geringer.

Der größte Unterschied wird im Penetrationsprofil nach 24 Stunden deutlich. Die Substanzmenge der obersten Schichten ist signifikant größer. In der Tiefe sind die Werte denen des rechten Armes relativ ähnlich.

Nach 96 Stunden sind nur noch sehr geringe Mengen vorhanden. Auch hier sind die Werte etwas höher.

3. Versuchsreihe: Probandeneinfluss (Proband 3, linker Arm, Tioveil AQ-N)

Dieser Teil der Untersuchungen diente der Analyse des Probandeneinflusses auf das Penetrationsverhalten von Titandioxid. Dazu wurde eine weitere Abrissserie bei einem anderen Probanden durchgeführt.

Das Hornschichtprofil ist ebenfalls unauffällig und unterscheidet sich nur unwesentlich von dem des Probanden 2. Prinzipiell ist ein sehr ähnliches Penetrationsverhalten zu erkennen. Die geringfügigen Unterschiede drücken sich in den Abbildungen durch ein leicht verändertes Muster der Substanzverteilung aus (Abbildung 15).

Das Penetrationsprofil von Proband 3 zeigt nach einer Stunde etwas mehr Titandioxid in den oberen Hornschichten als im Fall von Proband 2.

Im Profil nach 24 Stunden befindet sich in den meisten Schichten weniger Titandioxid im Vergleich zu Proband 2.

Der Probandenvergleich nach 96 Stunden wiederum ergibt in den ersten Schichten der Hornhaut deutlich mehr Substanz bei Proband 3.

Bei allen 3 Versuchsreihen zeigt sich eine rasche Abnahme der Konzentration der Partikel, je tiefer man in die Hornschicht vordringt. Die hauptsächliche Menge befindet sich in den obersten 25 %. Auch in der Tiefe der Hornschicht (70. Abrisse) lässt sich Titandioxid in geringer Menge nachweisen. Schon nach 24 Stunden ist die Gesamtmenge in der Hornschicht erheblich vermindert, insbesondere die Werte der obersten Abrisse sind wesentlich kleiner. Auch nach 96 Stunden sind minimale Mengen in der Tiefe nachweisbar.

Tabelle 8: Konzentrationen von Titandioxid auf den Abrissen [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$].

Abriss- nummer	1. Versuchsreihe			2. Versuchsreihe			3. Versuchsreihe		
	1 h	24 h	96 h	1 h	24 h	96 h	1 h	24 h	96 h
1	19,12			15,34			31,19		
2	18,28	0,65	0,09	16,50	4,00	0,26	11,14	2,81	0,95
3	12,33			10,59			8,70		
5	5,55	0,33	0,05	5,74	1,10	0,17	8,52	1,55	0,43
10	1,73	0,26	0,05	1,75	0,32	0,05	2,47	0,26	0,25
15	0,59			0,84			1,61	0,15	0,10
20	0,01	0,21	0,01	0,34	0,22	0,03	0,38	0,04	0,05
30	0,21			0,49			0,94		
40	0,06	0,21	< 0,01	0,23	0,12	0,03	0,41	0	0,01
50	0,03			0,04			0,08		
60								0	0,02
70	0	0,06	0,01	0,01	0,20	0,03	0	0	< 0,01

1. Versuchsreihe

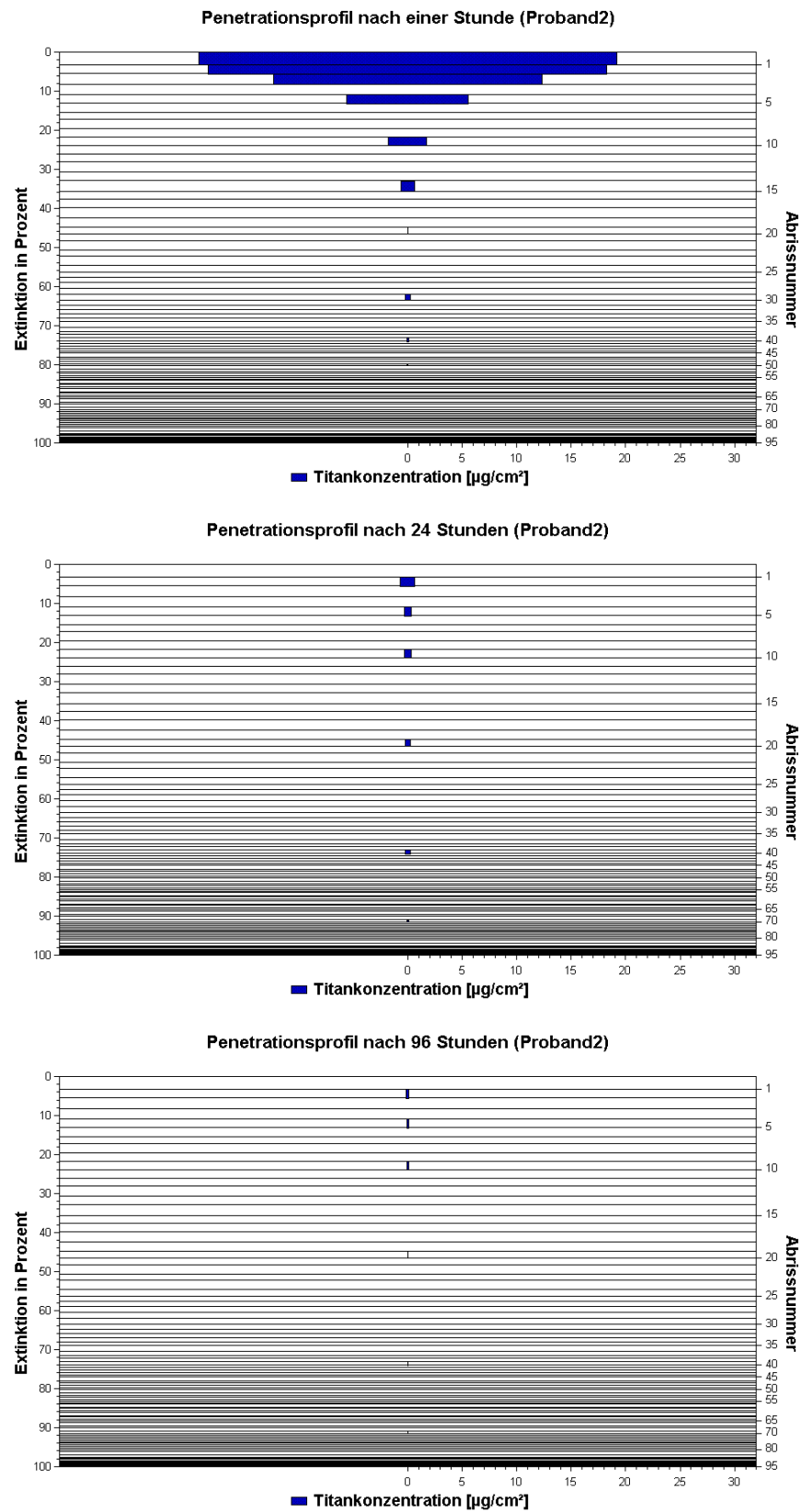


Abbildung 13: Penetrationsprofile Proband 2, UV-Titan, rechter Arm.

2. Versuchsreihe

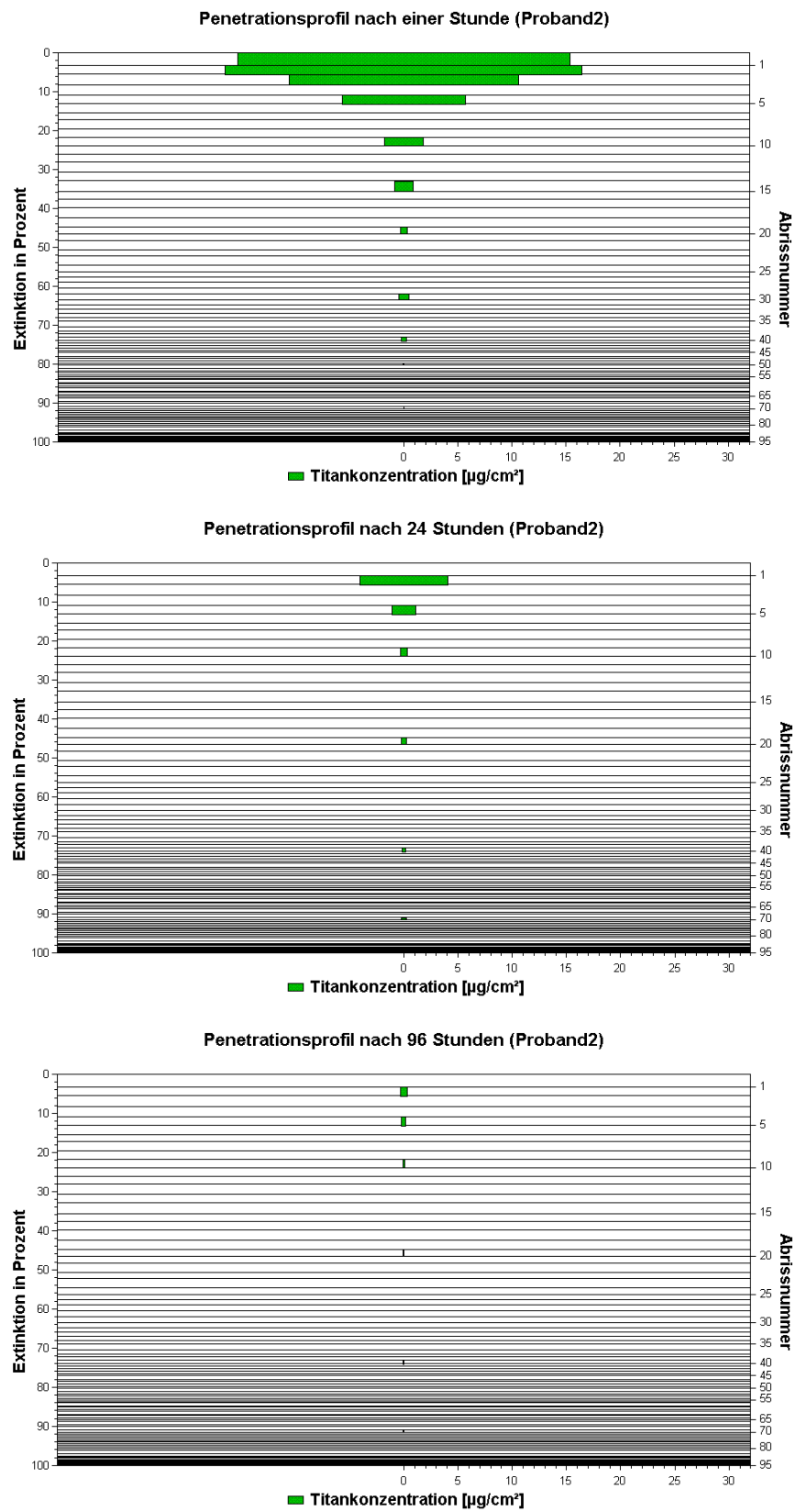


Abbildung 14: Penetrationsprofile Proband 2, Tioveil, linker Arm.

3. Versuchsreihe

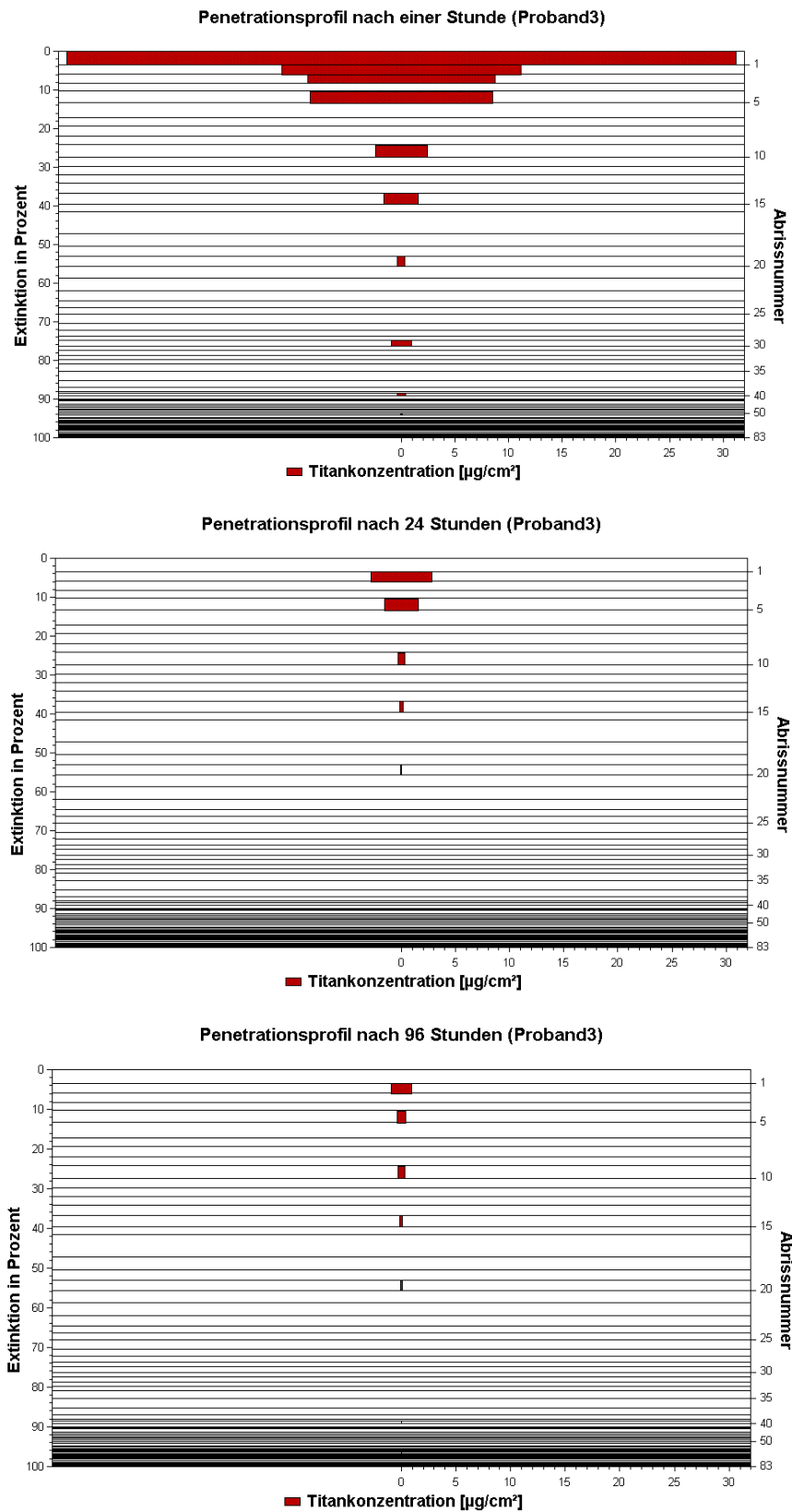


Abbildung 15: Penetrationsprofile Proband 3, Tioveil, linker Arm.

3.2 Zweiter Teil der Versuche: Penetrationswege

3.2.1 Erster Vorversuch: Detektion der Follikelöffnungen auf den Abrissen

Bei den Untersuchungen mit der Abrissmethode in Zusammenhang mit Titandioxid wurden folgende Beobachtungen gemacht:

Durch den hohen Titangehalt der Emulsion war die Haut nach der Applikation leicht weiß gefärbt. Im Laufe des Abrissverfahrens begann sie sich zu röten, die flächige weißliche Färbung verschwand. Gleichzeitig blieben auf der Haut einige kleine weiße Punkte sichtbar, für die ein Bezug zu den Follikelöffnungen anzunehmen war.

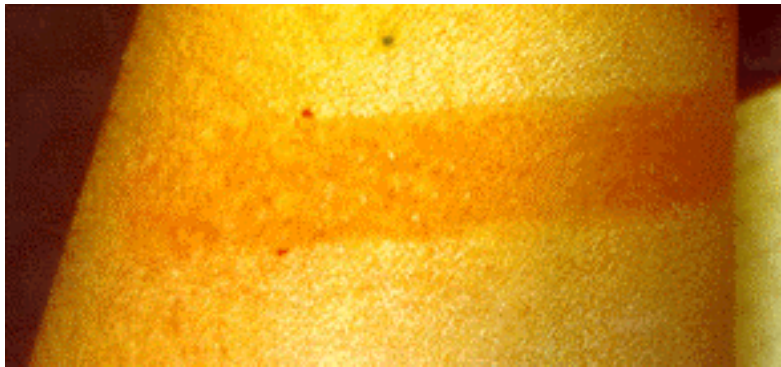


Abbildung 16: Rötung der behandelten Haut nach 40 Abrissen. Man erkennt einige weiße Punkte in dem geröteten Areal.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die Abrisse nach dem beschriebenen Verfahren mit Osmiumtetroxid gefärbt, um so die Follikelöffnungen zu markieren. In der folgenden Abbildung ist ein 25. Abriss nach der Färbung dargestellt.

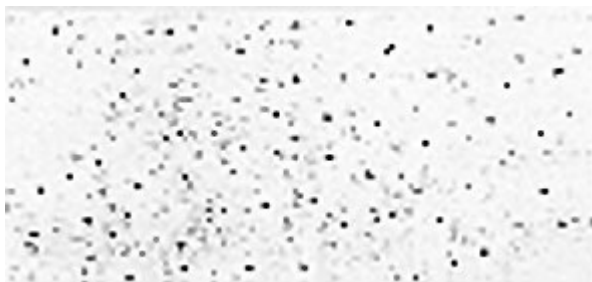


Abbildung 17: Abriss (25.) nach Titandioxid-Applikation mit Osmiumtetroxid gefärbt.

Es sind deutlich einzelne kleine Punkte zu erkennen. Die gefärbten Strukturen sind relativ gleichmäßig über die Abrissfläche verteilt.

3.2.2 Zweiter Vorversuch: Detektion der Partikel mit Laser-Scan-Mikroskopie

Der Vergleich der Reflexions- und Fluoreszenzaufnahmen der Titandioxidproben, welche mit Hilfe der Laser-Scan-Mikroskopie erhalten wurden, zeigt ein identisches Verteilungsmuster der Partikelreflexion und der Fluoreszenz der Beschichtung.

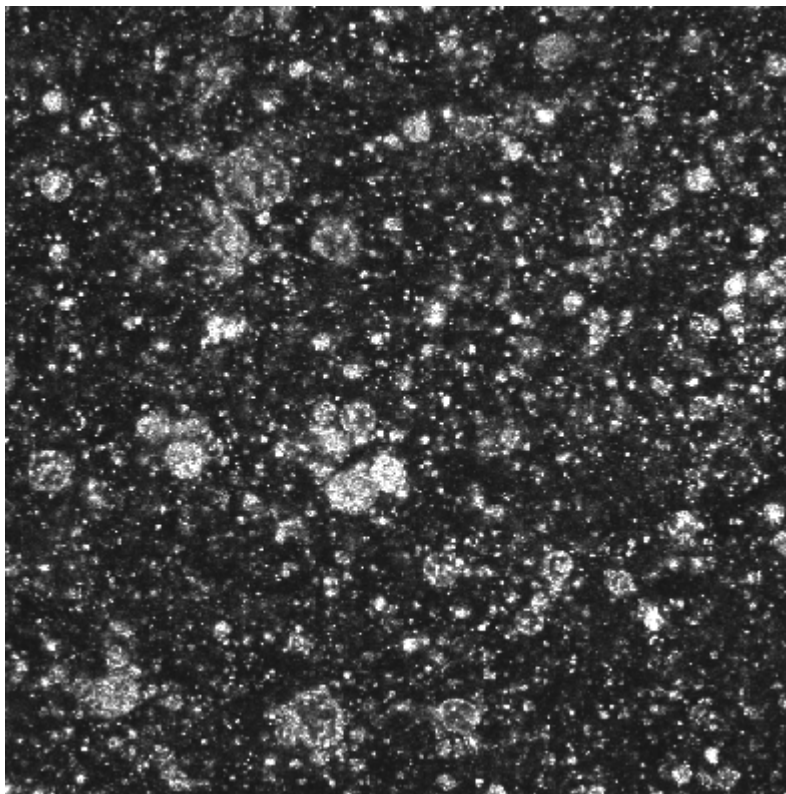


Abbildung 18: Titandioxidpartikel, Reflexionsmessungen.

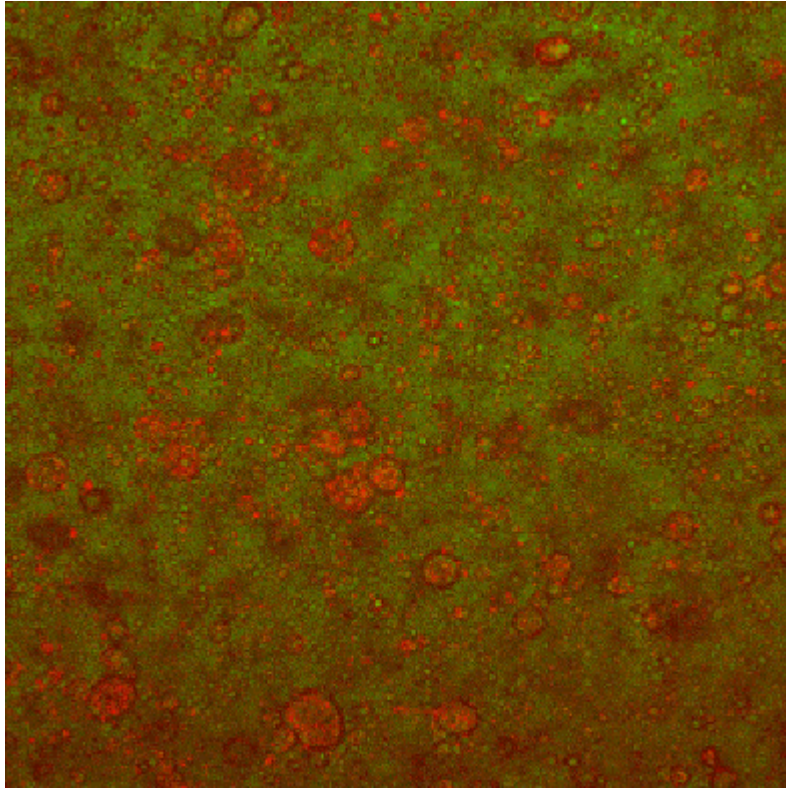


Abbildung 19: Titandioxidpartikel, Fluoreszenzmessungen (gleicher Ausschnitt).

3.2.3 Versuch: Ortsaufgelöster Nachweis der Partikel auf den Abrissen

Bei der Untersuchung der Tesafilm-Abrisse unter dem Laser-Scan-Mikroskop stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz der Beschichtung der Partikel auf den Abrissen nicht homogen verteilt, sondern an verschiedene Strukturen gebunden ist. Außerdem unterscheidet sich die Verteilung auf den Abrissen, welche aus verschiedenen Schichten des Stratum corneum entnommen wurden, stark.

Abriss aus dem obersten Teil der Hornschicht

Die folgende Abbildung zeigt einen typischen Abriss vom obersten Teil der Hornschicht unter dem Laser-Scan-Mikroskop, aufgenommen als Überlagerung der Transmissions- und Fluoreszenzaufnahme. Die Transmission ist grün dargestellt. Sie zeigt den leeren Tesafilmstreifen und die Korneozytenaggregate. Die Fluoreszenz ist rot dargestellt.

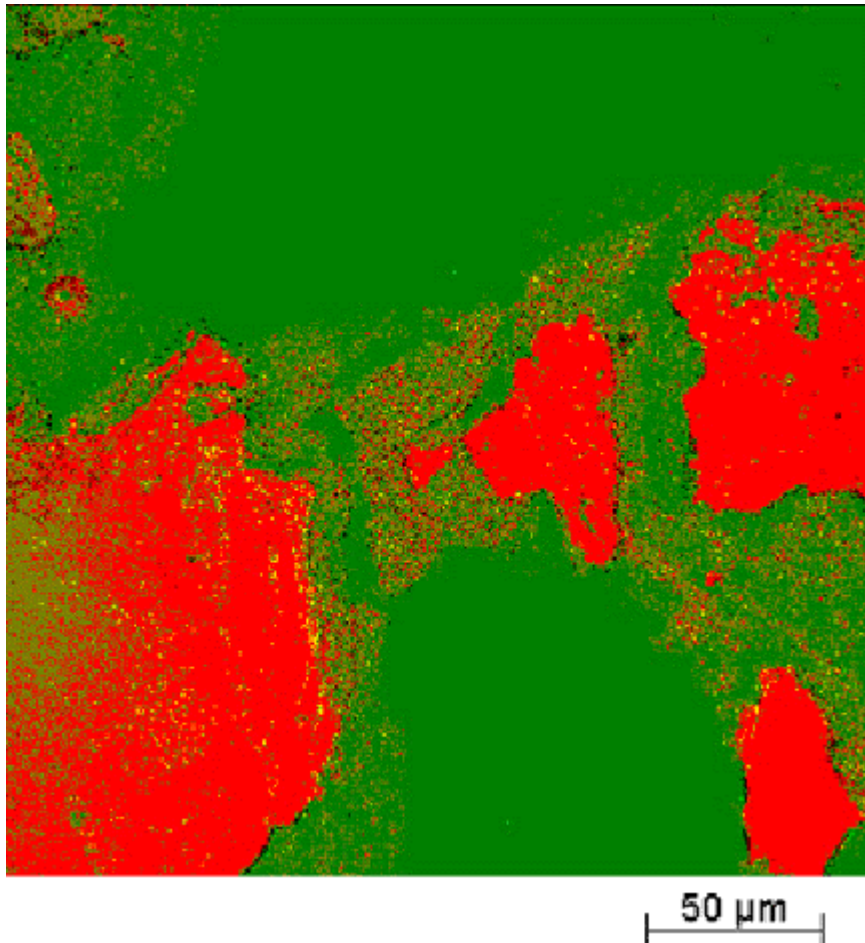


Abbildung 20: Typische Verteilung der Partikel (rot) auf dem 2. Abriss, der stellvertretend für einen Abriss der obersten Schicht der Hornschicht entnommen wurde (Aufnahme mit dem Laser-Scan-Mikroskop, Überlagerung von Transmission und Fluoreszenz).

Auf Abbildung 20 ist die charakteristische Fluoreszenz der Titandioxidprobe zu sehen, die in den Konturen der Hornschuppen auftritt. Die Partikel sind also an die Hornschuppen angelagert. Zusätzlich kann man erkennen, dass um die Hornschuppen herum Emulsionsbestandteile vorhanden sind. Auch dort erkennt man fluoreszierende Partikel.

In den mit Osmiumtetroxid angefärbten Follikelöffnungen konnten kleine Mengen Titandioxid nachgewiesen werden. Aufgrund der starken Fluoreszenzsignale aus den Bereichen der Hornschuppen wurden diese Signale teilweise überlagert. Dadurch wurde das Erkennen der schwächeren Signale aus den Follikelöffnungen in den zugehörigen Bildern wesentlich erschwert.

25. Abriss

Diese Situation verändert sich, wenn Abrisse aus tieferen Schichten des Stratum corneum entnommen werden. Stellvertretend für die tieferen Schichten ist hier ein angefärbter Follikelabdruck des 25. Abrisses (Abbildung 21) dargestellt. Er zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zum 2. Abriss.

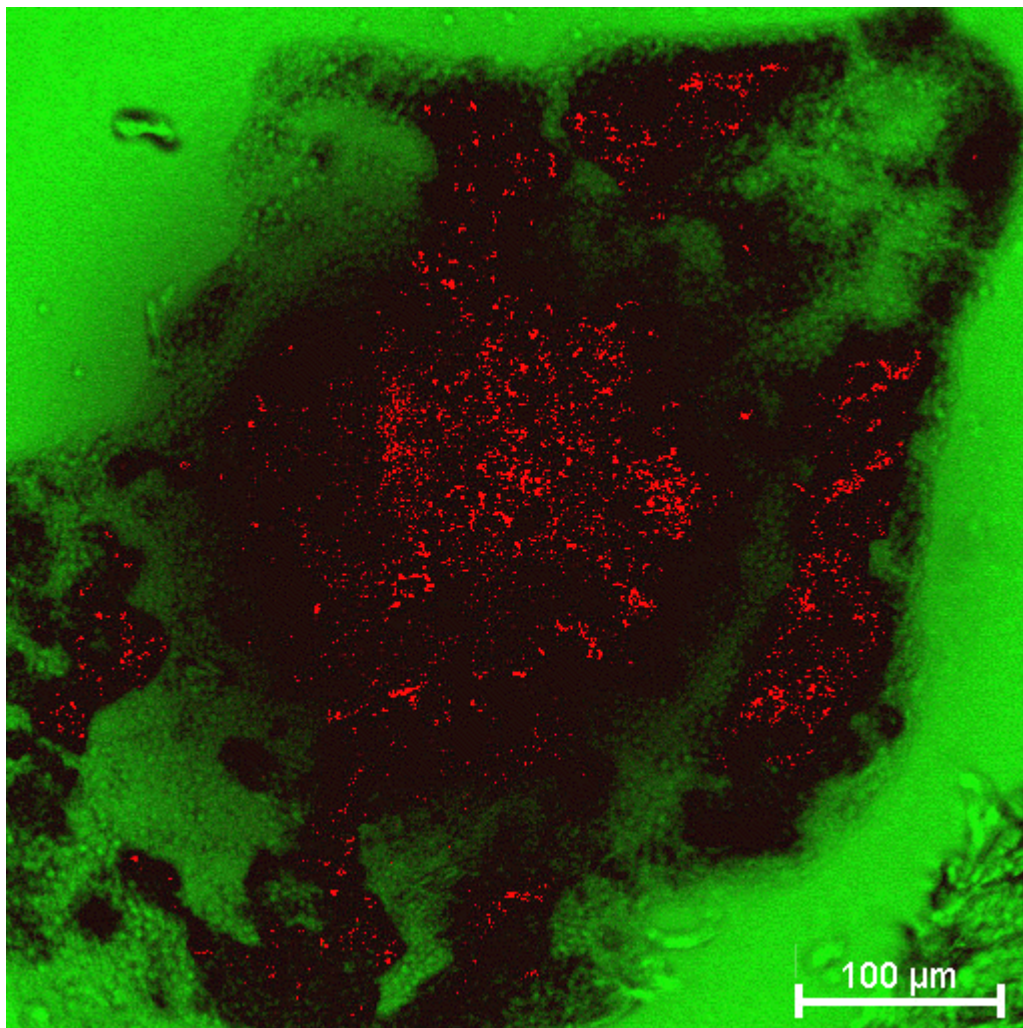


Abbildung 21: Follikelöffnung auf dem 25. Abriss unter dem Laser-Scan-Mikroskop.

Bei der Betrachtung des gefärbten Tesafilmstreifens unter dem Laser-Scan-Mikroskop sieht man über den Hornschuppen keine Fluoreszenz, hier befinden sich also keine Partikel. Die den Follikelöffnungen entsprechenden schwarzen Punkte sind dagegen gut zu erkennen. In einigen von ihnen kann man Fluoreszenzsignale identifizieren, die denen der Beschichtung der Partikel entsprechen. Diese Signale finden sich jedoch nur in etwa jeder achten Follikelöffnung. Außerhalb der Follikelöffnungen ist keine Fluoreszenz nachweisbar, weder auf den

Korneozyten noch innerhalb der Tesafilmbereiche.

Während die Beschichtung der Partikel durch die Fluoreszenzmessungen sehr genau nachgewiesen werden konnte, war eine Reflexionsmessung zum Nachweis des Titandioxids in diesem Fall nicht möglich, weil das Signal in den Bereichen der Follikelöffnungen durch die Osmiumtetroxid-Färbung gestört wurde.

Um sicherzustellen, dass die Fluoreszenz auch wirklich mit den beschichteten Partikeln korreliert, wurden die Abrisse zusätzlich mit Hilfe von Ramanspektroskopie analysiert.

Abbildung 22 zeigt das Spektrum der titandioxidhaltigen Emulsion (Eichspektrum).

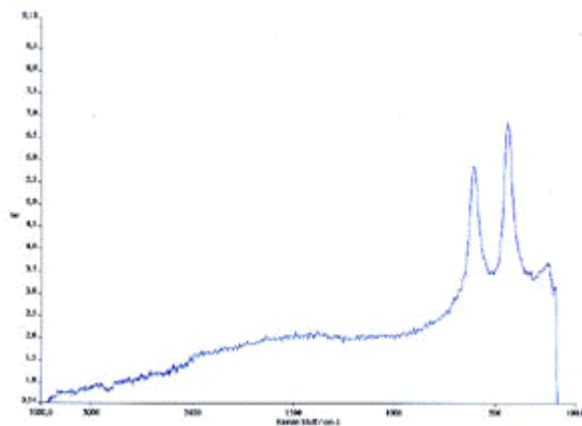


Abbildung 22: Das Raman-Spektrum der titandioxidhaltigen Emulsion (UV-Titan).

In Abbildung 23 ist ein Spektrum dargestellt (schwarz), das im Abdruck einer Follikelöffnung gemessen wurde, in dem zuvor Fluoreszenzsignale gefunden wurden. Trotz starker Rauschsignale erkennt man deutlich die Übereinstimmung mit dem überlagerten Eichspektrum (blau).

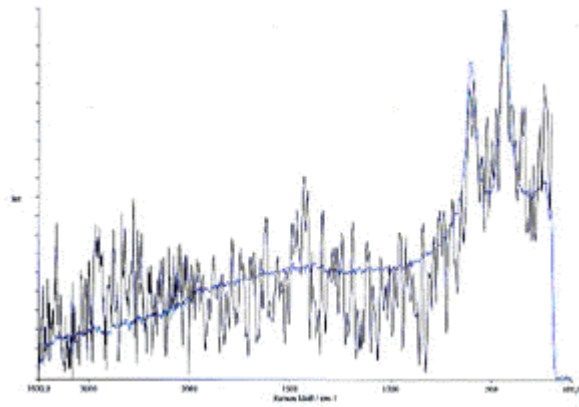


Abbildung 23: Spektrum der Messung innerhalb der Follikelöffnung (schwarz) im Vergleich mit dem Eichspektrum der titandioxidhaltigen Emulsion.

In Abbildung 24 werden die auf dem Abriss innerhalb (grün) und außerhalb (blau & schwarz) der Follikelöffnung gemessenen Spektren verglichen.

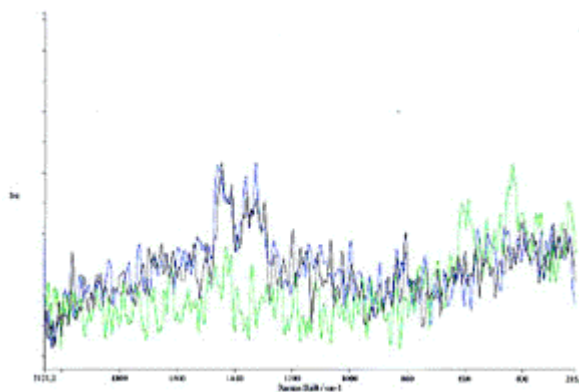


Abbildung 24: Spektrum der Messung innerhalb der Follikelöffnung (grün) im Vergleich mit den Spektren der Messungen außerhalb der Follikelöffnung (schwarz & blau).

Die Spektren zeigen, dass außerhalb der Follikelöffnungen kein Titandioxid nachgewiesen werden konnte.

Die Untersuchung mit Ramanspektroskopie bestätigt die Messung mit dem Laser-Scan-Mikroskop: Auf den Abrissen mit hoher Abrissnummer, die aus tieferen Schichten des Stratum corneum stammen, konnten die Mikropartikel nur in den Bereichen einiger Follikelöffnungen nachgewiesen werden.

3.2.4 Versuch: Nachweis der Follikelpenetration durch eine Biopsie

Ausgehend von den beschriebenen Untersuchungen und den nachgewiesenen geringen Konzentrationen von beschichtetem Titandioxid in den tieferen Schichten des Stratum corneum wurde im weiteren versucht zu klären, wie tief diese Substanz in die Follikel eindringt. Da mit der Abrissmethode nur das Stratum corneum erfasst wird, wurden gezielte Biopsien entnommen und untersucht.

1. HE-Färbung

Der mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte histologische Schnitt einer Biopsie verdeutlicht die Strukturen innerhalb der Epidermis und Dermis. In Abbildung 25 erkennt man einen vollständigen Follikel und rechts daneben eine Talgdrüse. Auf anderen Schnitten dieser Biopsie ist noch ein zweiter Follikel zu sehen. Die Biopsie weist keine Abnormitäten auf.

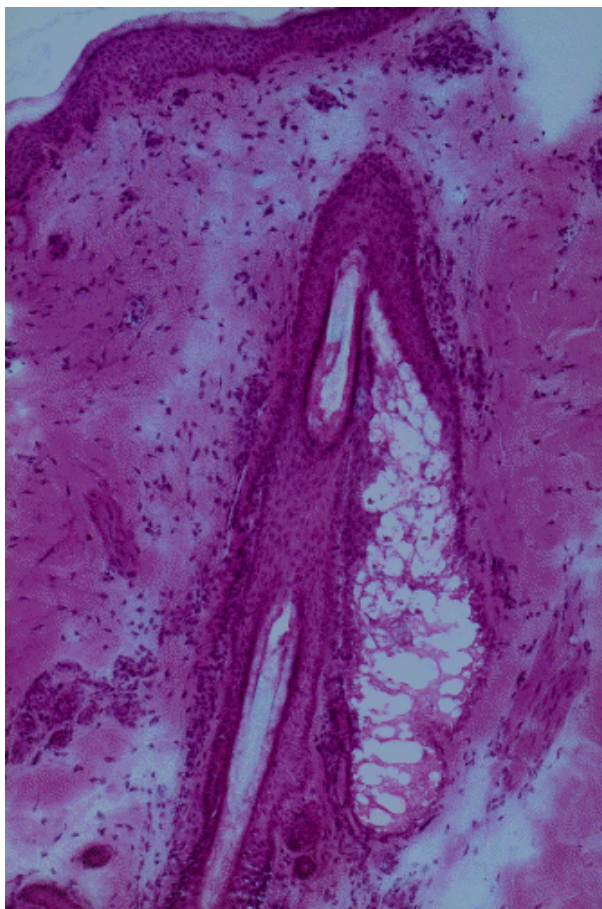


Abbildung 25: HE-Färbung eines Follikels der Biopsie

2. Fluoreszenzmessungen

Die Struktur des ungefärbten Gewebes konnte mit dem Laser-Scan-Mikroskop sichtbar gemacht werden (Abbildung 26). Auf der Abbildung erkennt man gut das Vorhandensein zweier Follikelkanäle. Die Bezeichnungen "rechter" und "linker Follikelkanal" im Folgenden beziehen sich auf diese Abbildung. Der Durchmesser des Messspots betrug 50 μm .

Es stellte sich heraus, dass die in den Follikeln natürlich vorhandene Substanz in einem ähnlichen Wellenlängenbereich fluoresziert wie die Beschichtung der Partikel. Diese Tatsache führte zu einer Überlagerung beider Fluoreszenzsignale, die den Nachweis der Partikel erschwerte.

Daher wurden die weiteren Untersuchungen mit Röntgenfluoreszenzmessungen durchgeführt.

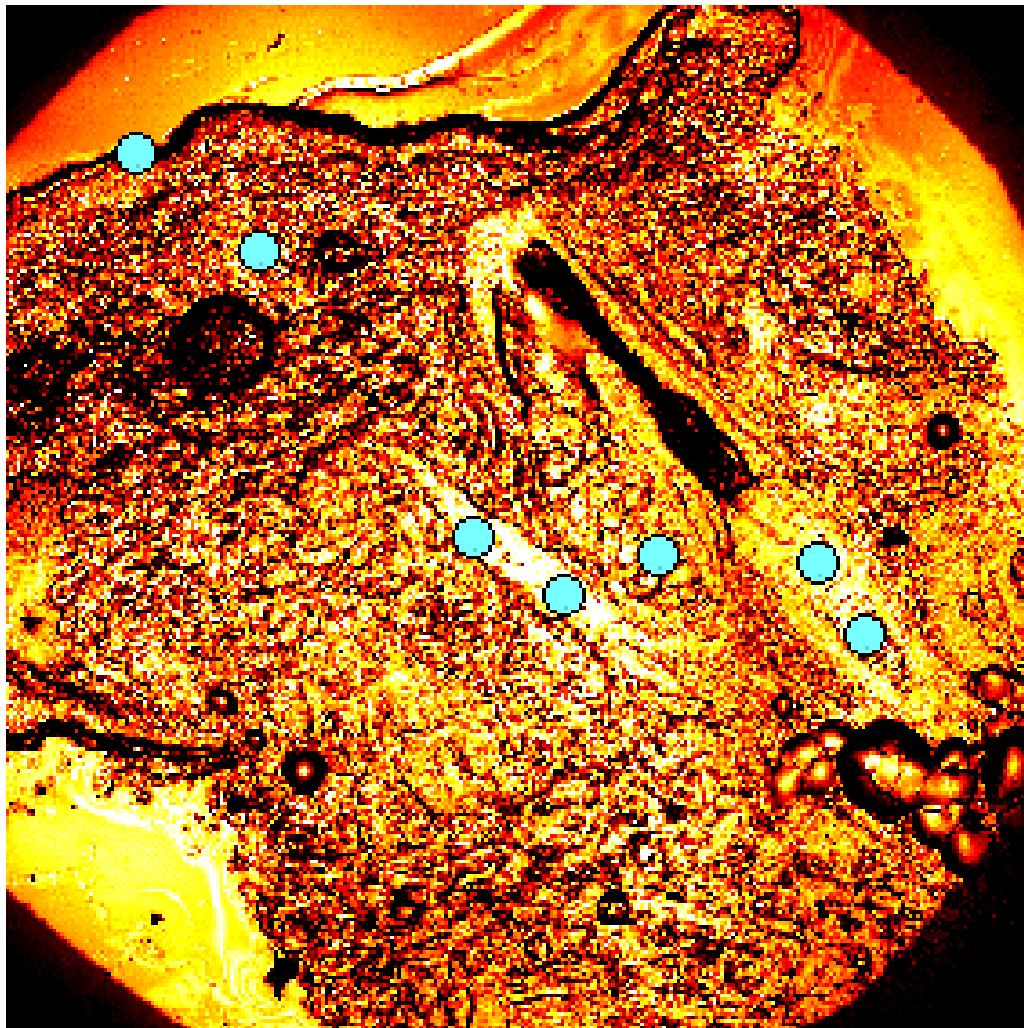


Abbildung 26: Struktur des ungefärbten Gewebes, Laser-Scan-Mikroskopie. Die blauen Punkte markieren charakteristische Messpunkte.

3. Röntgenfluoreszenzanalyse

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Proben unter Anwendung der Röntgenfluoreszenzanalyse war es möglich, das Vorhandensein von Titan im Gewebe direkt zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass sich bezüglich der gemessenen Titankonzentration die Schnitte grob in drei verschiedene Bereiche einteilen ließen.

Erster Bereich: Epidermis

In allen Schnitten konnten im Bereich der Epidermis Spuren von Titan festgestellt werden. Abbildung 27 zeigt ein Röntgenfluoreszenzspektrum innerhalb der Epidermis mit einem gut sichtbaren titanspezifischen Peak bei 4,5 keV. Dieses Ergebnis korrespondiert mit den Abrissuntersuchungen, die gezeigt haben, dass auch nach dem 10. Abriss eine Restkonzentration von Titandioxid auf der Haut gefunden werden konnte.

Zweiter Bereich: Rechter Follikelkanal

Innerhalb des rechten Follikelkanals konnte Titan in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Die Konzentration verringerte sich innerhalb des Kanals von der Öffnung zur Wurzel hin stark. In allen Schnitten, die Teile dieses Follikels enthielten, wurden Titanspuren innerhalb des Follikelkanals gefunden. Im benachbarten Follikelkanal (linker Follikelkanal in Abbildung 26) dagegen wurde in keinem Schnitt Titan gefunden.

Dritter Bereich: Alle anderen Gebiete der Biopsie

Außerhalb der beiden ersten Bereiche, also im Gebiet von lebenden Zellen, konnten keine Spuren von Titan nachgewiesen werden, auch nicht seitlich des Follikelkanals. Alle untersuchten Schnitte der Biopsie bestätigen dieses Ergebnis.

Titan wurde ausschließlich in den oberen Schichten des Stratum corneum und in einem der beiden Follikelkanäle gefunden.

Tabelle 9: Relative Röntgen-Fluoreszenzintensität von Titan in den Bereichen der Biopsie.

Gemessenes Gebiet der Biopsie	Relative Röntgen-Fluoreszenzintensität von Ti (Mittelwert \pm Standardabweichung)
Stratum corneum	$6,8 \pm 2,6$
Rechter Follikelkanal	$1,5 \pm 1,0$
Andere Gebiete der Biopsie	0

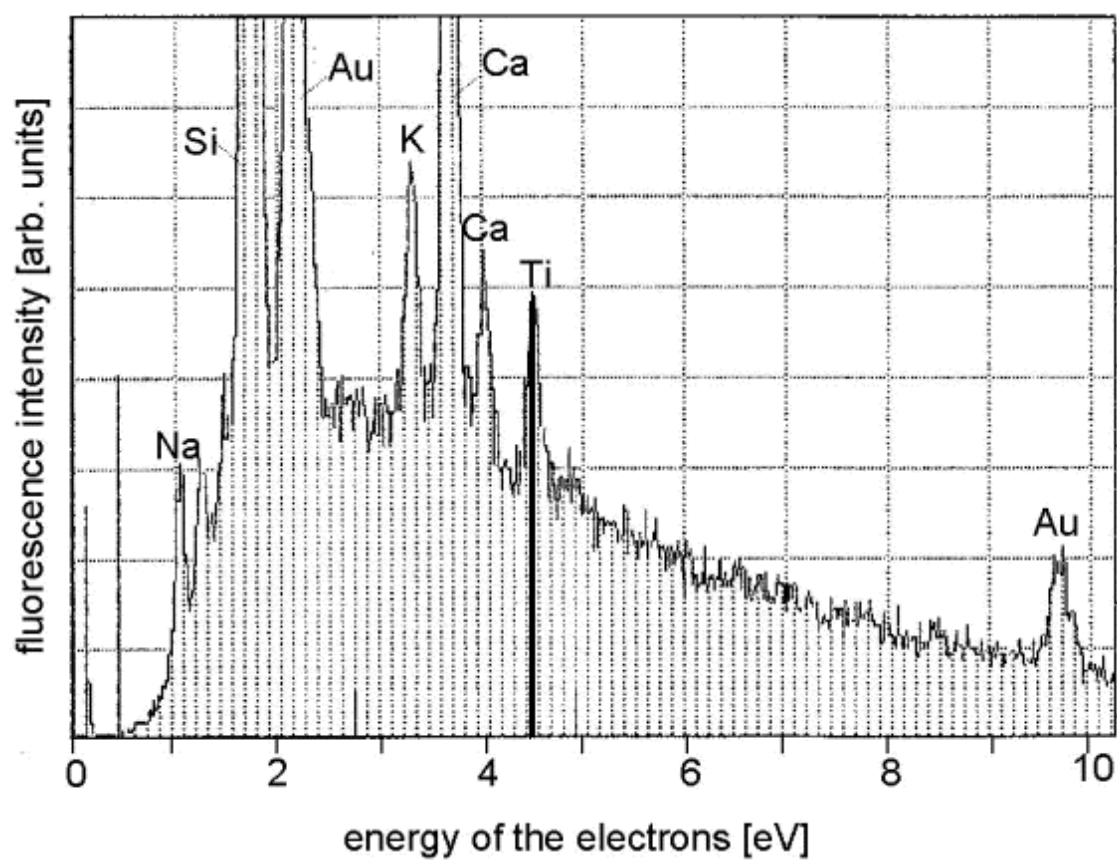


Abbildung 27: Nachweis des Titan-Peaks im Röntgenfluoreszenzspektrum in der Hornschicht der Biopsie.

4 DISKUSSION

4.1 Ist die Abrissmethode nach dem angewandten Verfahren für quantitative Penetrationsuntersuchungen geeignet?

Voraussetzung für vergleichbare und reproduzierbare Messungen ist, dass die Abrissmethode nach dem verwendeten Standard die Hornschicht vollständig und quantifizierbar entfernt.

In der Literatur finden sich eine Reihe von Beispielen dafür, dass diese Voraussetzungen nicht erfüllt wurden:

- In Versuchen Hojyo-Tomokas wurden nur 2/3 der Hornschicht entfernt; er entnahm 30-40 Abrisse [37].
- Van der Molen zeigte, dass nach Anwendung seiner Methode noch Korneozyten in den Furchen verblieben [63].

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen unter anderen Bedingungen durchgeführt wurden, als das in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Das betrifft in erster Linie Unterschiede im Gewebe. Die publizierten Ergebnisse wurden an exzidierte Haut erhalten. Weiterhin erfolgte der Andruck des Klebefilms auf der Haut durch Pressen und nicht durch Rollen.

Im Gegensatz dazu führte die hier verwendete Abrissmethode zu einer vollständigen Entfernung der Hornschicht, wie die Schnitte der Biopsie nach der Durchführung des Verfahrens zeigten. Diese Ergebnisse wurden in unabhängigen Untersuchungen an zwei weiteren Probanden reproduziert [49].

Die Histologie der Biopsie zeigt eine Schwellung der Haut. Diese Schwellung ist eine vitale Reaktion auf die mechanische Irritation der Haut durch die Abrissmethode. Sie ist Voraussetzung für die Straffung der Hautoberfläche und die Eliminierung der Falten und Furchen. Dieser Effekt lässt sich nur bei In-vivo-Experimenten erzielen, weil ausreichender Hautturgor und Schwellreaktion in vitro fehlen.

Im angewandten Verfahren wurde ein flexibler Klebefilm verwendet, der nicht einfach angedrückt wurde, sondern sich durch die Rollbewegungen an die Strukturen der Haut anschmiegte und dabei Unebenheiten ausglich. Dieses Verfahren ist ebenfalls nur in vivo sinnvoll, weil dafür eine ausreichende Elastizität der Haut notwendig ist, die in exzidierten

Proben nicht gegeben ist.

In nachfolgenden Abrissuntersuchungen mit Farbstoffen konnte verifiziert werden, dass im Ergebnis dieser Vorgehensweise keine Farbreste in den Furchen verblieben [49].

Darüber hinaus ist in Penetrationsversuchen mit anderen Substanzen (z. B. Eusolex) gezeigt worden, dass schon nach wenigen Abrissen keine Substanz mehr auf den Abrissen nachweisbar war [52]. Daraus folgt, dass der Einfluss der Furchen bei der im Rahmen der Untersuchungen eingesetzten Methode unerheblich ist.

Zusammenfassend ergibt sich die Aussage, dass die hier verwendete Abrissmethode die Hornschicht der Haut vollständig und gleichmäßig abträgt, der Einfluss der Furchen ist zu vernachlässigen. Sie ist damit für die angestrebten Untersuchungen geeignet.

4.2 Wie tief penetriert Titandioxid in die Hornschicht?

Das Auftreten potentieller Schädigungen durch Titandioxid setzt einen Kontakt mit den lebenden Zellen der Haut voraus. Für den Einsatz der Mikropartikel als Sonnenschutzmittel sollte daher ein Verbleib der Partikel in den äußeren Schichten des Stratum corneum ohne eine tiefere Penetration gesichert werden.

In den Langzeitpenetrationsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass ca. 90% der Substanz in der oberen Hälfte der Hornschicht lokalisiert war. Jedoch war auch in den unteren Schichten Titandioxid messbar, wenn auch in sehr geringer Menge am Rande der Nachweisgrenze.

Ein Kontakt von Titandioxid mit lebenden Zellen könnte nach diesen Ergebnissen also, wenn überhaupt, nur in verschwindend geringem Umfang zustande kommen.

In der Literatur finden sich zu diesem Thema scheinbare Widersprüche. Einerseits haben die Untersuchungen von Tan messbare Konzentrationserhöhungen von Titandioxid in der Dermis nach Langzeitapplikation ergeben. Dazu wurden Biopsien entnommen, die Hornschicht durch Abriss entfernt und die Konzentration in der verbleibenden Probe ermittelt [89].

Andererseits konnte Castiel-Higounenc bei Experimenten an Diffusionszellen zeigen, dass keine Penetration von Titandioxid in die Dermis stattfindet [12].

Darüber hinaus ist bei In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen menschlicher und tierischer Haut unter dem Elektronenmikroskop Titandioxid ausschließlich in den äußeren Schichten der Hornschicht gefunden worden [12, 35, 54, 68].

Allerdings gibt es bei Pflücker Hinweise darauf, dass in den Haarfollikeln auch in tieferen Schichten Titandioxid nachweisbar ist (In-vitro-Untersuchungen an Schweinehaut) [68]. Für

Zinkoxid konnte Lansdown eine Penetration in die Haarfollikel zeigen [54].

Bei der Einschätzung der potentiellen Gefährdung dieser geringen Titandioxidmengen ist zu berücksichtigen, dass diese Substanz Bestandteil in Nahrungsmitteln und Arzneimitteln ist [10, 28].

Die Ergebnisse der Langzeitpenetrationsuntersuchungen konnten klären, wie Titandioxid in der Hornschicht verteilt ist. Offen blieb die Frage, an welche Strukturen der Hornschicht das Titandioxid assoziiert ist. Daher bedurfte es weiterer Experimente mit besonderem Augenmerk auf die Haarfollikel als potentielle Penetrationswege. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Punkt 4.7 ausführlich diskutiert.

4.3 Wie verändert sich die Titandioxid-Konzentration im Laufe der Tage?

Bei der Diskussion der beobachteten Erniedrigung der Titandioxid-Konzentration müssen zwei Bereiche unterschieden werden, der oberflächennahe Bereich und die tieferen Schichten des Stratum corneum.

An der Hautoberfläche kommt es spontan insbesondere mechanisch induziert laufend zum Abschuppen einzelner Korneozyten-Aggregate (Desquamation insensibilis), so dass schon im Normalzustand eine dauernde Regeneration des Epithels stattfindet [14, 70]. Dieser Vorgang ist wesentlich für die drastische Abnahme der Titandioxidkonzentration in den oberen Schichten des Stratum corneum schon nach 24 Stunden verantwortlich. Zusätzlich müssen Verluste durch die Textilabdeckung während dieser Zeit in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz dazu ist für die Titandioxid-Konzentration in den unteren Schichten im Zeitraum von 24 bis 96 Stunden eine relativ geringe Abnahme zu beobachten. Angenommen, Titandioxid wäre ausschließlich in der Hornschicht verteilt, wäre zu erwarten, dass mit der natürlichen Regeneration der Haut auch die Titandioxidpartikel aus den tieferen Schichten des Stratum corneum zur Hautoberfläche geschoben werden. Dann dürfte an der Grenze zu den lebenden Zellen der Epidermis, also auf den unteren Abrissen, nach diesen Zeiten kein Titandioxid mehr nachweisbar sein. Jedoch wurden hier geringe Konzentrationen gemessen.

Dieses Ergebnis und die bisher vorliegenden Hinweise auf ein Vorkommen von Titandioxid in den Follikelkanälen, die in die lebende Epidermis und Dermis hineinreichen, erforderten genauere Untersuchungen der Verteilung von Titandioxid in den Strukturen der Haut (siehe 4.7).

4.4 Welchen Einfluss haben unterschiedliche Beschichtungen des Titandioxids auf den Penetrationsprozess? Welche Rolle spielen interindividuelle Unterschiede?

Die Aluminiumoxidbeschichtung der verwendeten Partikel unterschied sich vor allem durch den Zusatz von Stearinsäure (UV-Titan) bzw. Natriumpolyacrylat (Tioveil).

Bei einem Probanden wurden Emulsionen, die jeweils eine der beiden Substanzen enthielten, an je einem Arm aufgetragen. Die Unterschiede der Penetrationsprofile sind sehr gering. Im Rahmen der durchgeführten Messungen konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden.

Die Penetrationsprofile der beiden Probanden, bei denen die gleiche Substanz aufgetragen wurde (Tioveil), zeigen geringe Unterschiede im Verteilungsmuster. Es konnten aber keine auffälligen Abweichungen im Penetrationsverhalten der beiden Substanzen aufgezeigt werden. Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten, müssten die Untersuchungen an weiteren Probanden und mit anderen Beschichtungen durchgeführt werden.

4.5 Kann man mit Osmiumtetroxid die Position der Haarfollikel auf den Abrissen sichtbar machen?

Im Haarfollikel befindet sich der Ausgang einer Talgdrüse. Das von ihr produzierte Sebum setzt sich zusammen aus freien Fettsäuren, gebundenen Fettsäuren und anderen Substanzen, wie Squalen, Cholesterin und Wachsen [32].

Mit der beschriebenen Methode ist es gelungen, die Positionen der Follikelöffnungen auf den Abrissen mit Osmiumtetroxid anzufärben (Abbildung 17). Das Verteilungsmuster der schwarzen Punkte entsprach dem der Haarfollikel [69]. In nachfolgenden Versuchen mit Cyanoacrylatabrissen konnte eine genaue fotografische Zuordnung der einzelnen Punkte zu Haarfollikeln durchgeführt werden [50].

Damit wurde gezeigt, dass die beschriebene Färbemethode geeignet ist, die Follikelöffnungen auf den Abrissen sichtbar zu machen.

4.6 Können die Partikel mit Fluoreszenzmessungen unter dem Laser-Scan-Mikroskop sichtbar gemacht werden?

Wie schon berichtet, konnte nach Anregung der UV-Titan-Partikel unter dem Laser-Scan-Mikroskop mit einer Wellenlänge von 415 nm eine schwache charakteristische Fluoreszenz mit Wellenlängen höher als 600 nm beobachtet werden.

Die Reflexionsmessungen haben die Verteilung von Titandioxid dargestellt, die Fluoreszenzsignale ergaben exakt das gleiche Muster (Abbildungen 18 und 19). Damit wurde gezeigt, dass die fluoreszierende Substanz an die Partikel gebunden ist. Der Nachweis von Titandioxid-Mikropartikeln durch die Fluoreszenzsignale war also möglich und konnte im weiteren genutzt werden, um die Partikel auf den Abrissen sichtbar zu machen.

4.7 Welche Rolle spielen die Follikel bei der Penetration von Titandioxid?

Im Verlauf des Abrissverfahrens wurden an der Entnahmestelle im Bereich von Follikelöffnungen weiße Punkte sichtbar, die dem Verteilungsmuster der Haarfollikel entsprachen. Das führte zur Annahme, dass Titandioxid in die Follikelöffnungen penetriert.

Auch in der Literatur gibt es Hinweise auf die wichtige Rolle der Haarfollikel bei der Penetration.

Illel konnte bei In-vitro-Untersuchungen der Haut von haarlosen Ratten zeigen, dass bei einigen Substanzen (z. B. Hydrocortison, Koffein) der Hauptweg der Penetration die Haarfollikel sind [40]. Versuche mit ähnlichen Modellen und anderen Substanzen führten zum gleichen Ergebnis [5, 87].

Schaefer zeigte in Penetrationsuntersuchungen, dass Cadmiumsulfid tief in die Haarfollikel eindringt [85]. Bei den Penetrationsuntersuchungen von Lansdown wurde Zinkoxid auf Hasenhaut aufgetragen, nach der Entfernung der Hornschicht durch die Abrissmethode wurde elektronenmikroskopisch Zinkoxid in den Haarfollikeln nachgewiesen [54].

Pflücker fand bei seinen In-vitro-Experimenten an Schweinehaut nach zehn Abrissen ebenfalls Titandioxid in den Follikelöffnungen [68].

Die vorliegende Arbeit bestätigt den Einfluss der Follikel auf das Penetrationsverhalten von Titandioxid.

Die beschichteten Partikel waren im oberen Teil der Hornschicht hauptsächlich auf den

Korneozyten lokalisiert. Die Titandioxidkonzentration nahm mit wachsender Tiefe des Stratum corneum rasch ab. In der unteren Hälfte waren die Korneozyten frei von Mikropartikeln. In dieser Region fanden sich Partikel ausschließlich in den Follikelöffnungen. Das konnte durch die Laser-Scan-Mikroskopie und Ramanspektroskopie belegt werden.

Diese Ergebnisse wurden durch die Auswertung der Biopsie bestätigt. Die Röntgenfluoreszenzmessungen zeigten Titandioxidpartikel nur in einem Follikelkanal und nicht im umliegenden Gewebe. Darüber hinaus wurde der gesamte Kanal beurteilt. Bis zur Haarwurzel ließ sich Titandioxid nachweisen. Das Verhältnis der Titandioxidkonzentration im unteren Abschnitt des Follikelkanals zu der Konzentration in der Follikelöffnung betrug etwa 1:100.

Daraus ließen sich folgende Aussagen ableiten:

1. Der Hauptteil des topisch applizierten Titandioxids ist in den obersten Schichten des Stratum corneum lokalisiert.
2. Titandioxid penetriert nicht durch die Hornschicht.
3. In den tieferen Hautschichten ist Titandioxid ausschließlich in den Follikelkanälen lokalisiert, das umgebende Gewebe ist partikelfrei, d. h. die Titandioxid-Mikropartikel kommen nicht mit lebenden Zellen in Kontakt.

Diese Ergebnisse bieten die Möglichkeit, die scheinbaren Widersprüche in der vorliegenden Literatur zu lösen.

So lassen sich die Resultate von Tan mit diesen Ergebnissen in Einklang bringen. Die dort in Epidermis und Dermis gefundenen geringen Titandioxidmengen sind auf das Vorkommen in den Follikelkanälen zurückzuführen [89].

Auch der Ausschluss der Titandioxidpenetration in die Haut bei Castiel-Higounenc wird bestätigt [12].

Aus dem Vorhandensein von Titandioxid in den Follikelkanälen kann nicht auf einen Kontakt mit lebenden Schichten der Haut geschlossen werden; die oberen 3-4 mm des Kanals sind ebenfalls mit einer Hornschicht ausgekleidet, so dass es nicht zur Penetration kommen kann.

Die Vorgänge im unteren Bereich des Follikelkanals müssen weiter untersucht werden, spielen allerdings eine untergeordnete Rolle, weil die gemessene Titandioxidkonzentration dort verschwindend gering ist. Damit ist gezeigt, dass ein biologisch relevanter Kontakt des topisch

applizierten Titandioxids mit den lebenden Zellen der Haut ausgeschlossen werden kann.

Prinzipiell müssen auch die Schweißdrüsen als Penetrationswege bedacht werden. Jedoch entleeren sich die Schweißdrüsen wesentlich schneller und intensiver als die Haar- und Talgdrüsenkanäle. Daher reichern sich die Partikel voraussichtlich nicht in den Schweißdrüsen an [31].

Die Experimente sind an gesunder Haut durchgeführt worden, Aussagen für vorgeschädigte Haut lassen sich daraus nicht mit Sicherheit ableiten.

Es wäre sinnvoll, die Rolle der Follikel auf das Penetrationsverhalten anderer Substanzen zu untersuchen. Der Einfluss müsste für kleinere Moleküle vermutlich wesentlich größer sein als für die untersuchten Titandioxid-Mikropartikel.

4.8 Wird in allen Haarfollikeln Titandioxid gefunden?

Die Untersuchungen der Abrisse aus den tieferen Schichten unter dem Laser-Scan-Mikroskop haben gezeigt, dass Titandioxidpartikel ausschließlich in den Follikelkanälen lokalisiert waren. Die Fluoreszenzsignale ließen sich aber nicht in jedem Haarfollikel, sondern nur in etwa jedem achten nachweisen.

Die Biopsie enthielt zwei Follikelkanäle. Vor der Entnahme der Biopsie wurden mehrere Abrisse entfernt, dadurch die Follikelöffnungen als weiße Punkte sichtbar gemacht und das Gewebe um einen dieser Punkte ausgestanzt. Damit war sichergestellt, dass die Biopsie einen vollständigen Follikelkanal enthielt. In diesem Haarfollikel wurde Titandioxid nachgewiesen, der zweite Follikelkanal war dagegen titandioxidfrei.

Es gibt also sowohl Follikelkanäle, in die Titandioxid penetriert, als auch solche, in die es nicht penetriert. Dieser Effekt ist in der Literatur bisher nicht erwähnt. Es ist von großem Interesse, nach den Ursachen dieser Unterschiede zu suchen. Ein Zusammenhang mit den Zyklusphasen des Haarwachstums wäre denkbar.

4.9 Welche Aussagen können zum Einsatz von Titandioxid als Sonnenschutzmittel gemacht werden?

Beschichtetes Titandioxid ist ein zugelassener Lichtschutzfilter und wird seit vielen Jahren in kommerziellen Produkten verwendet.

Titandioxid hat folgende Eigenschaften:

- Es bietet eine breite Schutzwirkung im gesamten Spektrum von UVA und UVB.
- Der erzielte Lichtschutzfaktor in Kombination mit organischen Filtersubstanzen ist recht hoch.
- Es penetriert nur in die obere Hornschicht, wie gezeigt wurde, und bildet dadurch einen gleichmäßigen Schutzmantel gegen die Strahlung.
- Eine Penetration in tiefere Hautschichten und ein damit verbundener Kontakt mit lebenden Zellen ist nicht nachweisbar.
- Der Einsatz in mikrofeiner Form ist kosmetisch zufriedenstellend.
- Beschichtetes Titandioxid ist chemisch und biologisch stabil, über dermatologische Schäden gibt es nur wenige Berichte.
- Das Risiko einer photokatalytischen Wirkung wird durch die Verwendung von beschichteten Partikeln minimiert und ist darüber hinaus auszuschließen, weil kein relevanter Kontakt des applizierten Titandioxids mit den lebenden Zellen stattfindet.

Damit erfüllen beschichtete Titandioxid-Mikropartikel alle Anforderungen an ein gutes Sonnenschutzmittel.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung dieser Arbeit war es, das Verhalten der in modernen Sonnenschutzmitteln eingesetzten Titandioxid-Mikropartikel mit quantitativen Methoden zu bestimmen, um Aussagen über ihre Eignung zu erhalten. Dabei stand die Frage nach der Verteilung der Substanz innerhalb des Stratum corneum im Mittelpunkt der Untersuchungen. Insbesondere war wegen der bekannten photokatalytischen Aktivität von Titandioxid zu klären, ob ein Kontakt mit den lebenden Bereichen der Haut ausgeschlossen werden kann. Für die Messungen wurden zwei kommerziell genutzte, unterschiedlich beschichtete Titandioxid-Mikropartikel eingesetzt.

Eine wesentliche Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Anwendung der Abrissmethode (Tape stripping) in Kombination mit der spektroskopischen Bestimmung der Extinktion im sichtbaren Bereich zur Berechnung des Hornschichtprofils. Die Konzentration der Titandioxid-Partikel wurde mit Hilfe von Röntgenfluoreszenz-Messungen bestimmt.

So war es erstmals möglich, in vivo standardisierte und reproduzierbare Untersuchungen zum Penetrationsverhalten von beschichteten Titandioxid-Mikropartikeln in die Hornschicht der menschlichen Haut durchzuführen.

Durch Langzeitapplikation der Substanzen und die Beobachtung der Titandioxidkonzentrationen in der Hornschicht über mehrere Tage konnten auch Aussagen zum Penetrationsverhalten der applizierten Mikropartikel gemacht werden.

Es wurde eindeutig gezeigt, dass die untersuchten Substanzen unabhängig von ihrer Struktur, von ihrer Beschichtung und vom Probanden hauptsächlich in den obersten Schichten des Stratum corneum lokalisiert sind.

Nach Klärung dieser grundsätzlichen Fragen war es notwendig, die Ursache für das Auftreten extrem geringer Titandioxid-Konzentrationen auf Abrissen zu bestimmen, die aus tieferen Schichten des Stratum corneum entnommen wurden. Durch die Kombination der Abrissmethode mit einem speziellen Färbeverfahren und der Laser-Scan-Mikroskopie ergaben sich deutliche Hinweise auf die Bedeutung der Follikelkanäle für das beobachtete Phänomen. Röntgenspektroskopische Untersuchungen an Biopsien zeigten, dass diese Mikropartikel in die Haarfollikel eindringen und damit Bereiche unterhalb des Stratum corneum erreichen. Hierbei wurden die Mikropartikel in dieser Region nur in Follikelkanälen, nicht aber im Bereich der lebenden Zellen nachgewiesen.

Diese Ergebnisse belegen, dass Titandioxid nur in einzelne Follikelkanäle penetriert, eine Aussage, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen erstmals beschrieben wurde.

In Übereinstimmung mit der Zielsetzung der Arbeit konnte unter Einsatz unterschiedlicher Untersuchungsmethoden gezeigt werden, dass die beschichteten Titandioxid-Mikropartikel im oberen Bereich der Hornschicht lokalisiert sind und damit als hocheffiziente Lichtschutzfilter den Schutz der darunter liegenden lebenden Bereiche der Haut garantieren.

Der sichere Nachweis der Titandioxid-Mikropartikel innerhalb einzelner Follikelkanäle besitzt grundsätzliche Bedeutung für das Verständnis von Penetrationswegen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams CWM: A histochemical method for the simultaneous demonstration of normal and degenerating myelin. *J Path Bact.* 1959; 77: 648-650.
2. Amenc A: Comparison of the penetration of organic and inorganic UV filters used in sunscreens into the stratum corneum by applying the tape stripping method. *Microthese.* 2001 Feb-Jul.
3. Aubin F: Immunological Effects of Ultraviolet A radiation (320-400 nm). *Euro Rencontres avec l'Hôpital. La Roche Posay. Medical Staff.* 1996 Feb; 140(2): 255-8.
4. Azurdia RM, Pagliaro JA, Diffey BL, Rhodes LE: Sunscreen application by photosensitive patients is inadequate for protection. *Br J Dermatol.* 1999 Feb; 140(2): 255-8.
5. Behl CR, Bellatone NH, Flynn GL: Influence of age on percutaneous absorption of substances; in Brounaugh RL, Maibach HI (Hrsg): *Percutaneous Absorption.* New York, Decker, 1985.
6. Bellobono JR, Bonardi M, Castellano L, Selli E, Righetto L: Degradation of some chloroaliphatic water contaminants by photokatalytic membrans immobilizing titanium dioxide. *J-Photochem-Photobiol. A: Chem.* 1992; 67: 109-15.
7. Bernard BK, Osheroff MR, Hofmann A, Mennear JH: Toxicology and carcinogenesis studies of dietary titanium dioxide-coated mica in male and female Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health.* 1990; 29(4): 417-29.

8. Bischoff F, Bryson G: Tissue reaction to and fate of parenterally administered titanium dioxide. I. The intraperitoneal site in male Marsh-Buffalo mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1982 Nov; 38(2): 279-90.

9. Böck P (Hrsg): Romeis Mikroskopische Technik. Kap. 4 & 19.

10. Brown MW, Galley E: Testing UVA and UVB Protection From Microfine Titanium Dioxide. *Cosmetics & Toiletries*. 1990; 105: 69-73.

11. Cai R, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A: Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer Res*. 1992 Apr 15; 52(8): 2346-8.

12. Castiel-Higuonenc I, Raufast V, Soubielle F, Msika P, Boyer-Denayrou F, Gall Y: Demonstration of Non-Penetration of Titanium Dioxide Contained in Photo-Protection Products an Ex Vivo Study Conducted on Human Skin. *Laboratoires Dermatologiques Avène*. 1995.

13. Coohill TP: The Biomedical Consequences of Ozone Depletion. *Ultraviolet Radiation Hazards*. 1994; 2134B: 20-23.

14. Czarnetzki B, Kerl H, Sterry W: *Dermatologie und Venerologie*. 1992; 1-11, 102.

15. Damian DL, Barnetson RS, Halliday GM: Effects of low-dose ultraviolet radiation on in vivo human cutaneous recall responses. *Australas J Dermatol*. 2001 Aug; 42(3): 161-7.

16. Diffey BL: Sun protection: have we gone too far? *Br J Dermatol*. 1998 Mar; 138(3): 562-3.

17. Diffey BL, Farr PM: Sunscreen protection against UVB, UVA and blue light: an in vivo and in vitro comparison. *Br J Dermatol*. 1991 Mar; *124*(3): 258-63.

18. Dreher F, Arens A, Hostynek JJ, Mudumba S, Ademola J, Maibach HI: Colorimetric method for quantifying human Stratum corneum removed by adhesive-tape stripping. *Acta Derm Venereol*. 1998 May; *78*(3): 186-9.

19. Driscoll KE, Maurer JK, Lindenschmidt RC, Romberger D, Rennard SI, Crosby L: Respiratory tract responses to dust: relationships between dust burden, lung injury, alveolar macrophage fibronectin release, and the development of pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990 Oct; *106*(1): 88-101.

20. Dundas SA, Laing RW: Titanium balanitis with phimosis. *Dermatologica*. 1988; *176*(6): 305-7.

21. Dupre A, Tournon P, Daste J, Lassere J, Bonafe JL, Viraben R: Titanium pigmentation. An electron probe microanalysis study. *Arch Dermatol*. 1985 May; *121*(5): 656-8.

22. Dussert AS, Gooris E, Hemmerle J: Characterization of the mineral content of a physical sunscreen emulsion and its distribution onto human stratum corneum. *International Journal of Cosmetic Science*. 1997; *19*: 119-129.

23. Elleder M: Studies in lipid histochemistry. XIII. The OPA (osmiumtetroxide-periodic acid-alpha-naphthylamine) method for the detection of apolar lipids. *Histochemistry*. 1975 Sep 29; *44*(4): 345-8.

24. Falabella R: Suction blistering as a research and therapeutic tool in dermatology. *Int J Dermatol*. 2000 Sep; *39*(9): 670-1.

25. Ferin J, Oberdörster G: Biological effects and toxicity assessment of titanium dioxides: anatase and rutile. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1985 Feb; 46(2): 69-72.
26. Finch GL, McNeill KL, Hayes TL, Fisher GL: In vitro interactions between pulmonary macrophages and respirable particles. *Environmental Research*. 1987; 42: 241-53.
27. Forbes PD: Influences of UVA in experimental photocarcinogenesis. *European Journal of Dermatology*. 1996 April-May; 6(3): 223-224.
28. Galley E, Roberts D, Ferguson J: Microfine titanium dioxide: a new route to dermatological sun protection; in R. Marks & K. Plewig (Hrsg), *The Environmental Threat to the Skin*. 1992, London, Dunitz, 137-142.
29. Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF: A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem Photobiol*. 1998 Sep; 68(3): 243-56.
30. Granstein RD: Evidence that sunscreens prevent UV radiation-induced immunosuppression in humans. Sunscreens have their day in the sun. *Arch Dermatol*. 1995 Oct; 131(10): 1201-4.
31. Hadgraft J: Transfollicular versus transdermal absorption. Presentation. 10th Congress of the European Academy of Dermatology, München 2001, wird in Kürze veröffentlicht.
32. Harkey MR: Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int*. 1993 Dec; 63(1-3): 9-18.
33. Hedenborg M: Titanium dioxide induced chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes. *Int Arch Occup Environ Health*. 1988; 61(1-2): 1-6.

34. Heinrich U, Muhle H, Takenaka S, Ernst H, Fuhst R, Mohr U, Pott F, Stober W: Chronic effects on the respiratory tract of hamsters, mice and rats after long-term inhalation of high concentrations of filtered and unfiltered diesel engine emissions. *J Appl Toxicol.* 1986 Dec; *6(6)*: 383-95.
35. Hemmerle J, Msika P, Gooris E: An electron microscopical approach to efficacy screening of physical sunscreens. *J Soc Cosmet Chem.* 1996 March/April; *47*: 59-72.
36. Hönigsmann H: UVA and Skin. *Euro Rencontres avec l'Hôpital.* La Roche Posay. Medical Staff. 1996; 2.
37. Hojyo-Tomoka MT, Kligman AM: Does cellophane tape stripping remove the horny layer? *Arch Dermatol.* 1972 Nov; *106(5)*: 767-8.
38. Hueber F, Wepierre J, Schaefer H: Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: in vivo study in the hairless rat. *Skin Pharmacol.* 1992; *5(2)*: 99-107.
39. Hurks HM, van der Molen RG, Out-Luiting C, Vermeer BJ, Claas FH, Mommaas AM: Differential effects of sunscreens on UVB-induced immunomodulation in humans. *J Invest Dermatol.* 1997 Dec; *109(6)*: 699-703.
40. Illel B, Schaefer H, Wepierre J, Doucet O: Follicles play an important role in percutaneous absorption. *J Pharm Sci.* 1991 May; *80(5)*: 424-7.
41. Jimbow K: [Development of targeted chemoradiotherapy for malignant melanoma by exploitation of metabolic pathway]. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 1998 Mar; *73(2)*: 105-10.

42. Judin VPS: The lighter side of TiO₂. Chemistry in Britain. 1993; 29: 503-5.
43. Kalia YN, Alberti I, Naik A, Guy RH: Assessment of topical bioavailability in vivo: the importance of stratum corneum thickness. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2001; 14 Suppl 1: 82-6.
44. Kim ST, Sancar A: Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. Photochem Photobiol. 1993 May; 57(5): 895-904.
45. Klaschka F, Nörenberg M: Individual transparency patterns of adhesive-tape strip series of the stratum corneum. Int J Dermatol. 1977 Dec; 16(10): 836-41.
46. Koizumi T: [Kinetic analysis of drug disposition and biological response]. Yakugaku Zasshi. 2000 May; 120(5): 445-54.
47. Kricker A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ: Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? A case-control study in Western Australia. Int J Cancer. 1995 Feb 8; 60(4): 489-94.
48. Krutmann J: Hautschädigungen durch UVA-Strahlung: Neueste Erkenntnisse. Derm. 1996; 2: 1-2.
49. Lademann J: Persönliche Information.
50. Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, Sterry W: Investigation of follicular penetration of topically applied substances. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2001; 14 Suppl 1: 17-22.

51. Lademann J, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, Shah VP, Sterry W: Quantification of Stratum Corneum removed by the Tape Stripping Method in Bioequivalence Studies, wird in Kürze veröffentlicht in Skin Pharm. Appl. Skin. Phys.

52. Lademann J, Weigmann HJ, Meffert H, Sterry W: Sonnenschutz - ein heißes Thema. Humboldt Spektrum. 2000; 3: 4-8.

53. Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W: Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 1999 Sep-Oct; 12(5): 247-56.

54. Lansdown ABG, Taylor A: Zinc and titanium oxides: promising UV-absorbers but what influence do they have on the intact skin? International Journal of Cosmetic Science. 1997; 19: 167-172.

55. Lavker MR, Kaidbey KH: Deleterious effects resulting from cumulative suberythral doses of UVA. Euro Rencontres avec l'Hôpital. La Roche Posay. Medical Staff. 1996; 2-3.

56. Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF: Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. Toxicol Appl Pharmacol. 1985 Jun 30; 79(2): 179-92.

57. Locher G: Permeabilitätsprüfung der Haut Exzemkranker und Hautgesunder für den neuen Indikator Nitrazingelb-Geigy. Modifizierung der Alkaliresistenzprobe, pH-Verlauf in der Tiefe des Stratum corneum. Dermatologica (Basel). 1962; 124: 159-182.

58. Loesch H, Kaplan DL: Pitfalls in sunscreen application. *Arch Dermatol*. 1994 May; *130*(5): 665-6.
59. Määttä K, Arstila AU: Pulmonary deposits of titanium dioxide in cytologic and lung biopsy specimens. Light and electron microscopic x-ray analysis. *Lab Invest*. 1975 Sep; *33*(3): 342-6.
60. Marttin E, Neelissen-Subnel MT, De Haan FH, Bodde HE: A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping. *Skin Pharmacol*. 1996; *9*(1): 69-77.
61. Moan J, Dahlback A, Larsen S, Henriksen T, Stamnes K: Ozone depletion and its consequences for the fluence of carcinogenic sunlight. *Cancer Res*. 1989 Aug 1; *49*(15): 4247-50.
62. Moan J, Peak MJ: Effects of UV radiation of cells. *J Photochem Photobiol B*. 1989 Oct; *4*(1): 21-34.
63. van der Molen RG, Spies F, van 't Noordende JM, Boelsma E, Mommaas AM, Koerten HK: Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. *Arch Dermatol Res*. 1997 Aug; *289*(9): 514-8.
64. Moran CA, Mullick FG, Ishak KG, Johnson FB, Hummer WB: Identification of titanium in human tissues: probable role in pathologic processes. *Hum Pathol*. 1991 May; *22*(5): 450-4.

65. Murphy GM: Sunblocks: mechanisms of action. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1999 Feb; *15(1)*: 34-6.
66. Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K, Tanaka N: The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat Res*. 1997 Nov 27; *394(1-3)*: 125-32.
67. Ogiso T, Iwaki M, Tanino T, Nishioka S, Higashi K, Kamo M: In vitro skin penetration and degradation of enkephalin, elcatonin and insulin. *Biol Pharm Bull*. 1997 Jan; *20(1)*: 54-60.
68. Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, Gärtner E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Gers-Barlag H: The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001; *14 Suppl 1*: 92-7.
69. Piérard GE, Piérard-Franchimont C, Le T, Lapiere C: Patterns of follicular sebum excretion rate during lifetime. *Arch Dermatol Res*. 1987; *279 Suppl*: S104-7.
70. Pinkus H: Tape stripping in dermatological research. A review with emphasis on epidermal biology. *G Ital Dermatol Minerva Dermatol*. 1966 Sep-Dec; *107(5)*: 1115-26.
71. Prawer SE: Sun-related skin diseases. *Postgrad Med*. 1991 Jun; *89(8)*: 51-4, 59-61, 64-6.
72. Raab W: Sonnenschutz: Aufgaben des Dermatologen. *TW Dermatologie*. 1994; *24*: 284-290.
73. Richards RJ, White LR, Elk-Nes KB: Biological reactivity of different crystalline forms of titanium dioxide in vitro and in vivo. *Scand-J-Work-Environ-Health*. 1985; *11*: 317-20.

74. Richer M, Allard S, Manseau L, Vallee F, Pak R, LeBel M: Suction-induced blister fluid penetration of cefdinir in healthy volunteers following ascending oral doses. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 May; *39*(5): 1082-6.

75. Riley PA: Photopigmentation. In Jori G, Pottier RH, Rodgers MAJ, Truscott TG: *Photobiology in Medicine*. NATO ASI Series A: Lief Sciences. Vol. 272 New York, Plenum Press, 1994; 99-112.

76. Rode LE, Ophus EM, Gylseth B: Massive pulmonary deposition of rutile after titanium dioxide exposure: Light-microscopical and physico-analytical methods in pigment identification. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. 1981 Nov; *89*(6): 455-61.

77. Roelandts R: Which components in broad-spectrum sunscreens are most necessary for adequate UVA protection? *J Am Acad Dermatol*. 1991 Dec; *25*(6 Pt 1): 999-1004.

78. Runger TM: Zielsetzung, Indikationen und Methoden des modernen Lichtschutzes. *Derm*. 1996; 2: 238-244.

79. Sancar A, Tang MS: Nucleotide excision repair. *Photochem Photobiol*. 1993 May; *57*(5): 905-21.

80. Sayre RM, Agin PP: A method for the determination of UVA protection for normal skin. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Sep; *23*(3 Pt 1): 429-40.

81. Schapira RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrissey J, Almagro UA, Dawson CA, Hacker AD: Hydroxyl radical production and lung injury in the rat following silica or titanium dioxide instillation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Feb; *12*(2): 220-6.

82. Scharffetter-Kochanek K, Schwarz T: Wirkung von UV-B Strahlung auf den Menschen. GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, 1996.
83. Schauder S: Neues zum Sonnenschutz von Kindern und Jugendlichen (Teil 2). Kosmetische Medizin. 1997; *18(4)*: 262-271.
84. Schauder S: Topical Sunscreens: Recent Developments. Euro Cosmetics. 1997; *(5/6)*: 20-30.
85. Schaefer H, Lademann J: The role of follicular penetration. A differential view. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2001; *14 Suppl 1*: 23-7.
86. Schaefer H, Lademann J, Worm M: Penetration von Allergenen. Wird veröffentlicht in Fuchs, Aberer: Kontaktekzem. Dustri-Verlag, Dr. Karl Feistle, Deisenhofen.
87. Schaefer H, Redelmeier TE: Skin Barrier. Basel, Karger, 1996.
88. Swartz HM, Liu KJ, Walczak T, Panz T, Kobayashi M, Zavadski W: Effects of coatings on the reactivity of inorganic sunscreen agents to light. J Cosmet Sci. 1998; *49*: 125-135.
89. Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ: A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. Australas J Dermatol. 1996 Nov; *37(4)*: 185-7.
90. Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M: Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. J Control Release. 2000 Apr 3; *65(3)*: 403-18.

91. Tribius S: Die photokatalytische Wirkung von Titandioxid (TiO₂) auf menschliche Fibroblasten und Keratinozyten in vitro. Dissertation. 1999.
92. Urbach F: Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. J Photochem Photobiol B. 1997 Aug; 40(1): 3-7.
93. Wamer WG, Yin JJ, Wei RR: Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. Free Radic Biol Med. 1997; 23(6): 851-8.
94. Weigmann H, Lademann J, Meffert H, Schaefer H, Sterry W: Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 1999 Jan-Apr; 12(1-2): 34-45.
95. Wolf J: Die innere Struktur der Zellen des Stratum desquamans der menschlichen Epidermis. Z Mikr Anat Forsch. 1939; 46: 170-185.
96. Zellmer S, Reissig D, Lasch J: Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction. J Control Release. 1998 Nov 13; 55(2-3): 271-9.

7 PUBLIKATIONSLISTE

Weigmann HJ, Lademann J, Rickmeyer C, Sterry W: Verfahren zur Charakterisierung des Penetrationsverhaltens von Wirkstoffen in die Haut. Technologietagung des BMBF, Biotechnologie/Medizintechnik, Berlin. 1997, Tagb. 144-6.

Rickmeyer C, Lademann J, Weigmann HJ, Sterry W: Penetration of titanium dioxide microparticles into the horny layer and the follicular orifice. Poster & Presentation. 10th European Students Conference, Berlin, 1999, Oct 20-23.

Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W: Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 1999 Sep-Oct; 12(5): 247-56.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Lademann für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und für die außergewöhnlich engagierte Betreuung. Seine fachliche Kompetenz, seine Geduld und sein Humor haben mir sehr geholfen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Weigmann herzlich danken, der mir mit viel persönlichem Einsatz zur Seite stand. Er war für mich bei der Analyse von Problemen und der Klärung von auftretenden Fragen unersetzlich.

Frau Schanzer und Frau Richter gilt mein besonderer Dank für die umfassende Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Sterry für die Möglichkeit, an der dermatologischen Klinik der Charité zu promovieren.

Mein Dank geht auch an Frau Dr. Audring für die histologischen Untersuchungen und an Herrn Waldschläger für die Durchführung der Röntgenfluoreszenzanalyse.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Christiane Rickmeyer, an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 12. Februar 2002